

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

8600-1
9
2-1

ARCHIV FÜR EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER

PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER

PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. L. LENDLE

PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

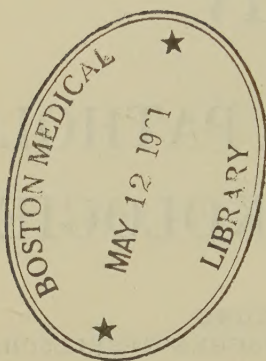
221. BAND

MIT 155 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG

1954



Alle Rechte vorbehalten.

Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.

Printed in Germany.

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.

Inhalt des 221. Bandes.

	Seite
Arteta, J. L., und J. R. Puchol, Über den Einfluß der experimentellen Blockierung des retikulo-endothelialen Systems mittels Trypanblau und Eisensaccharat auf die Anoxämie-Resistenz der Ratte. Mit 1 Textabbildung	387
Barghorn, H., s. Riechert, W.	
Bickhardt, R., und H.-J. Heite, Vergleichende Untersuchungen über die exsudationshemmende Wirkung von Calcium und Strontium am Eiweiß-ödem der Rattenpfote. Mit 1 Textabbildung	393
Bogatzki, M., ATP-Spaltung im denervierten atrophischen Muskel. Mit 5 Textabbildungen	76
Bornmann, G., s. Loeser, A., L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener.	
Dörner, J., Ist die auf nervalem Wege ausgelöste Gefäßdilatation nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol die Folge einer Hemmung des Sympathicotonus? Mit 2 Textabbildungen.	273
—, Zur Frage der Gefäßdilatation nach Adrenalin. Mit 4 Textabbildungen	286
—, Beitrag zur Frage einer quantitativen Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. REIN. Mit 2 Textabbildungen .	312
Elke, M., s. Fleckenstein, A., und J. Janke.	
Engelhardt, A., K. Greff, P. Holtz und R. v. Luecken, Zur Frage der Methylierung des Nor-adrenalins im Organismus. Mit 4 Textabbildungen. . .	506
Engels, H. J., Die Wirkung von Adrenalin auf die Schweißsekretion des Menschen bei elektrophoretischer Applikation. Mit 6 Textabbildungen .	355
Englhardt-Gölkel, A., s. Stuhlfauth, K.	
Filippi, R. G., s. Häusler, H. F.	
Flatters, M., Über die Vorzüge der Verwendung von Ratten-Uteri im Proöstrus zur Auswertung von Oxytocin. Mit 6 Textabbildungen	171
Fleckenstein, A., J. Janke und M. Elke, Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und von anderen Phosphorverbindungen bei der Coffein-Kontraktur des Frosch- und Kröten-Rectus. Mit 2 Textabbildungen	404
Flick, H., s. Friebel, H.	
Frey, J., Über Stoffwechselwirkungen von α -Tokopherolen, im besonderen untersucht an der Niere. Mit 3 Textabbildungen	466
—, und G. Hoffmann, Untersuchungen am isolierten Warmblüterherzen über die Wirkung des dl- α -Tokopherol. Mit 2 Textabbildungen	477
—, Über den Einfluß von dl- α -Tokopherol auf den fermentativen Phosphatstoffwechsel bei Tubuluszellen der Rattenniere. Mit 1 Textabbildung. .	482
Friebel, H., und H. Flick, Über das steuerbare Meerschweinchenasthma. II. Mitteilung: Versuche mit Acetylcholin	258
Friebel, H., und H. Flick, Über die Steigerung der broncholytischen Wirkung des Adrenalins durch einige Aralkylamine	267
Frimmer, M., und K. Pfleger, Untersuchungen über den Einfluß der Nebennieren auf die Eliminationsfähigkeit des reticulo-endothelialen Systems für makromolekulare Fremdkörper. VII. Mitteilung über RES-Clearance. Mit 3 Textabbildungen.	89

Genuit, H. , Registrierung der Herzfrequenz mit Hilfe der Blutamplitude. Mit 4 Textabbildungen	1
—, Untersuchungen über das sogenannte Auslöschphänomen bei doppelseitiger Vagusreizung. Mit 9 Textabbildungen	135
Giertz, H., F. Hahn und R. Schunk , Über Bindung und Elimination von Herzglykosiden in der Leber und Niere von Meerschweinchen	34
Ginzl, K. H., H. Klupp, O. Kraupp und G. Werner , Ganglionär blockierende Wirkungen von Polymethylen-bis-Phosphonium-Verbindungen. Mit 4 Textabbildungen	336
Greeff, K., s. Engelhardt, A., P. Holtz und R. v. Luecken.	
Grosskinsky, L., s. Loeser, A., G. Bornmann, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener.	
Hahn, F., s. Giertz, H., und R. Schunk.	
Häusler, H. F., und R. G. Filippi , Über schraubenförmige Struktur von Arterien. III. Mitteilung. Pharmakologische Strukturanalyse von Herzkranzgefäßen. Mit 6 Textabbildungen	187
Heite, H.-J., s. Bickhardt, R.	
Hensel, H., s. Schwalb, H.	
Herz, A. , Schmerzauslösung, Entzündungserregung und Wirkung auf die Capillaren bei Benzo- und Naphthochinonen und die Beziehung dieser Erscheinungen zur Hemmung der Dehydrasen des aeroben Kohlenhydratabbaus. Mit 2 Textabbildungen	108
Hess, G., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener.	
Hildebrandt, F., und E. Matthäy , Die Wirkung der starken Analgetica Polamidon, Polamidon C (Polamivet) und Dromoran auf die Darmmotilität. Mit 3 Textabbildungen	399
Hinrichs, K., H. Poppe und H. Steyer , Verteilung, Resorption und Ausscheidung nach wiederholter oraler Gabe von Conteben. Mit 4 Textabbildungen	6
Hoffmann, G., s. Frey, J.	
Hofmann-Credner, D. , Die Verwertung von Jodid und elementarem Jod durch die Schilddrüse des Hundes bei direktem Angebot	238
Holtz, P., s. Engelhardt, A., K. Greeff und R. v. Luecken.	
Illig, H., C. Mauthe und E. Müller , Die Wirkung von Histamin-Injektionen in die Arteria renalis im Hinblick auf die Masugi-Nephritis	381
Janke, J., s. Fleckenstein, A., und M. Elke.	
Jung, F., s. Scheler, W.	
Karges, O., und W. Mond , Vergleichende Untersuchungen des Na-, K- und Ca-Gehaltes und der Eiweißfraktionen in Serum, Ascites und Pleuraergüssen	228
Katsura, S. , Pharmakologische Untersuchungen über Hinokitiol (m-Iso-propyltropolon)	215
Keiderling, W., und F. Wöhler , Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens. I. Mitteilung. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ferritins. Mit 11 Textabbildungen	418
Keller, N., und G. Linden , Der Einfluß von Desoxycorticosteron auf den Glykogengehalt der Leber bei weißen Ratten. Mit 1 Textabbildung	219
Kessel, M., P. Körtge und F. A. Pezold , Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien. I. Mitteilung. Über das Verhalten der Serumeiweißkörper beim Kaninchen unter experimenteller chronischer Allylformiatvergiftung. Mit 2 Textabbildungen	123
Kipping, H. , Experimentelle Untersuchungen über einen Penicillinester mit besonderer Leber-Gallen-Affinität. Mit 6 Textabbildungen	350

Klupp, H., s. Ginzel, K. H., O. Kraupp und G. Werner.	
Koch, R., und M. Schwab, Die Messung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens am gesunden Menschen vor und nach Digitoxin	145
—, Der Einfluß der Pantothensäure auf die adrenalektomierte Ratte	460
Kopf, R., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, K. Ritter, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener.	
Körtge, P., s. Kessel, M., und F. A. Pezold.	
Kraupp, O., s. Ginzel, K. H., H. Klupp und G. Werner.	
Kuschinsky, G., und H. Lüllmann, Beitrag zur pharmakologischen Analyse der Muskelwirkung des Salyrigan und anderer thiolopraver Substanzen	299
Langecker, H., und E. Schulze, Die Verteilung von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und Sulfacarbamid auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund. Ein Beitrag zur Dynamik von Verteilungsvorgängen. II. Mitteilung. Mit 1 Textabbildung	160
—, Die Verteilung von Hexamethylentetramin auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund. Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung. III. Mitteilung. Mit 1 Textabbildung	166
Lehr, H., s. Peters, K.	
Lembeck, F., Über den Nachweis von 5-Oxytryptamin (Enteramin, Serotonin) in Carcinoidmetastasen. Mit 7 Textabbildungen	50
Lendle, L., s. Schultze, F.	
Leuschner, F., Eine chromatographische Methode zur Bestimmung des Isocotinsäurehydrazid	323
Linden, G., s. Keller, N.	
Loeser, A., in Zusammenarbeit mit G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener, Diäthylenglykol. Neuere Beiträge zur Pharmakologie und Toxikologie der Polyglykole. Mit 4 Textabbildungen	14
v. Luecken, R., s. Engelhardt, A., K. Greeff und P. Holtz.	
Lüllmann, H., und E. Muscholl, Über die Wirkung hypotoner Salzlösungen auf das Rattenzwerchfell. Mit 3 Textabbildungen	209
—, s. Kuschinsky, G.	
Lüttgau, H.-C., Über die Zunahme der Akkommodationskonstanten λ des isolierten N. ischiadicus nach Zusatz von Hyaluronidase. Mit 3 Textabbildungen	233
Di Maggio, Pharmakologische Studien über Thiazole. VII. Mitteilung: Schutzwirkung der 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure gegenüber experimenteller Äthylalkoholvergiftung. Mit 4 Textabbildungen	434
Matthäy, E., s. Hildebrandt, F.	
Matthies, H., Über Stoffwechselleistungen von roten Blutkörperchen. I. Kationentransport und Methämoglobinerückbildung. Mit 4 Textabbildungen	497
Mauthe, C., s. Illig, H., und E. Müller.	
Mond, W., s. Karges, O.	
Müller, E., s. Illig, H., und C. Mauthe.	
Muscholl, E., s. Lüllmann, H.	
Peters, K., und H. Lehr, Über den Einfluß von Megaphen auf die Wurzelspitzenzellen von <i>Vicia faba equina</i> . Mit 7 Textabbildungen	365
Pezold, F. A., s. Kessel, M., und P. Körtge.	
Pfleger, K., s. Frimmer, M.	
Poppe, H., s. Hinrichs, K., und H. Steyer.	
Puchol, J. R., s. Arteta, J. L.	
Rauscher, H., und W. Schneider, Zur Verwendung des Fructosetests bei der Ratte unter besonderer Berücksichtigung seiner Eignung für den Nachweis schwacher androgener Effekte	447

Riechert, W., und H. Barghorn, Beeinflussung des Rattenpfotenödems und des Lungenödems nach doppelseitiger Vagotomie durch Mutterkornalkaloide, durch Narkose (Avertin) und deren Charakterisierung durch Trypanblau.	489
Ritter, K., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, A. Schmitz, E. Stürmer und H. Wegener.	
Schäfer, P., Pharmakologische Beeinflussung von Hauttransplantaten. II. Mitteilung. Mit 4 Textabbildungen	517
Scheler, W., und F. Jung, Zur Häm-Häm-Wechselwirkung beim roten Blutfarbstoff. Mit 4 Textabbildungen	152
Schimmel, W., und H. Schwalb, Über die Beziehungen zwischen arteriellem Kreislauf und Nierenfunktion unter der Wirkung von Hexamethoniumbromid.	177
Schleyer, F., Papierelektrophoretische Untersuchungen des Eiweißbildes von Leichenseren. Mit 3 Textabbildungen	306
Schlüssel, H., Beitrag zur Verwertung mehrwertiger Alkohole in der Ernährung	67
Schmitz, A., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, E. Stürmer und H. Wegener.	
Schneider, W., s. Rauscher, H.	
Schunk, R., s. Giertz, H., und F. Hahn.	
Schultze, F., und L. Lendle, Pharmakologische Beeinflussung von Vagusreizeffekten am Froschherzen	95
Schulze, E., s. Langecker, H.	
Schwab, M., s. Koch, R.	
Schwalb, H., und H. Hensel, Über den Einfluß des Coffeins auf Nierendurchblutung, Glomerulusfiltrat und Diurese des Menschen	198
—, Die Wirkung des Oxyäthyl-Theophyllins auf die Nierenfunktion unter dem Einfluß von Hexamethoniumbromid.	373
—, s. Schimmel, W.	
Schwerd, W., s. Weinig, E.	
Steyer, H., s. Hinrichs, K., und H. Poppe.	
Stuhlfauth, K., und A. Englhardt-Gölkel, Über die Beeinflussung der Schlafzeit nach Pentothal-Natrium bei normalen und nebennierenlosen Ratten durch Glucose und Fructose	328
Stürmer, E., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz und H. Wegener.	
Volkmer, E., und H. Wintzer, Über die optisch-motorische Reflexerregbarkeit des mit γ -Hexachloreyclohexan vergifteten Frosches. Mit 1 Textabbildung	441
Wegener, H., s. Loeser, A., G. Bornmann, L. Grosskinsky, G. Hess, R. Kopf, K. Ritter, A. Schmitz und E. Stürmer.	
Weinig, E., und W. Schwerd, Über die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholkonzentration beim Menschen. Mit 15 Textabbildungen	243
Werner, G., s. Ginzl, K. H., H. Klupp und O. Kraupp.	
Wintzer, H., s. Volkmer, E.	
Wöhler, F., s. Keiderling, W.	

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. LOESER).

Registrierung der Herzfrequenz mit Hilfe der Blutdruckamplitude.

Von

H. GENUIT.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1953.)

Den Erfolg der Vagusreizung pflegt man an der Änderung der Herzfrequenz zu messen. Die notwendigen Zahlenwerte erhält man durch Auszählen der Blutdruckkurve oder des EKG — ein etwas mühsames Verfahren, das zudem auch gewisse Mindestgeschwindigkeiten der Kymotrommel verlangt. Die fortlaufende Registrierung der Herzfrequenz mit Hilfe eines Ordinatenschreibers ist sinnfälliger und einfacher in der Auswertung. Dabei hat der Ordinatenschreiber den Vorzug gegenüber anderen Geräten für Frequenzregistrierung, das zeitliche Intervall von jedem Herzschlag bis zu dem darauf folgenden anzuzeigen. Die Steuerung dieses Gerätes erfolgt bisher entweder durch das EKG oder durch einen Kontakthebel, der mit dem freigelegten Herzen verbunden ist*. Beide Verfahren erfordern erheblichen Aufwand — das eine hinsichtlich der Apparate (EKG), das andere in operativer Hinsicht. Ein verhältnismäßig einfaches Verfahren ohne Thoraxeröffnung, das die Blutdruckamplitude als Steuerungsvorgang benutzt, wird nachfolgend beschrieben. Man benötigt dazu ein Kontaktmanometer und einen modifizierten Ordinatenschreiber.

1. Kontaktmanometer.

Bei Versuchen mit dem schon früher von GENUIT u. RUPPERT angegebenen Kontaktmanometer zeigte sich, daß sich diese Konstruktion noch weiter verbessern ließ. Das Endergebnis längerer Versuche mit Membran- und Quecksilbermanometern ist nachstehende recht einfache Form, die sehr zuverlässig arbeitet.

Der Schwimmer eines Quecksilbermanometers von etwa 5 mm Rohrweite erhält einen senkrechten Schlitz. Durch diesen wird ein 0,6 mm starker V2a-Draht (K_2) geführt, dessen unteres Ende in der abgebildeten Form gebogen ist. Das obere Ende von K_2 trägt einen Kopf aus Plexiglas, der mit einem Längsschlitz versehen ist. In diesen Schlitz ragt — senkrecht zu K_2 verlaufend — K_1 hinein. K_1 ist ein Stückchen Platindraht von 0,6—0,8 mm Stärke, das in beliebiger Weise senkrecht

* Eine Steuerung durch das Tieftonmikrofon von BRECHT und BOUCKE, Pflügers Arch. 256, 43 (1952), müßte ebenfalls möglich sein, ist aber m. W. noch nicht technisch durchgeführt worden.

am Stahldraht des Schwimmers befestigt wird, und das zwischen dem oberen Rand des Schlitzes und dem Ende von K_2 einen kleinen Spielraum hat. Die untere Hälfte von K_2 taucht in das Quecksilber ein und wird infolge der Kohäsion des Quecksilbers gegen die Wandung des Glasrohres gedrückt. Das hat zur Folge, daß K_2 den Bewegungen des Quecksilberspiegels nicht unmittelbar folgt, sondern erst dann, wenn K_1 gegen K_2 oder den oberen Rand des Schlitzes stößt. So entstehen an dieser Stelle Öffnung und Schließung des Stromes, der vom Quecksilber aus über K_2 und K_1 zu dem Stahldraht des Schwimmers fließt. Dieser läuft am oberen Ende des Rohres durch eine Führung aus Stahl oder Hartgummi, die in ihrem oberen Abschnitt eine Quecksilberschicht enthält. Durch diese Anordnung ist eine

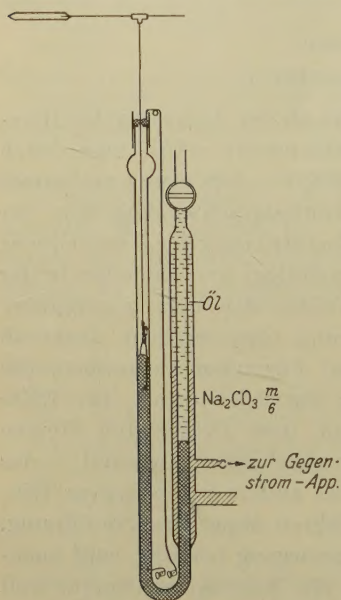


Abb. 1. Kontaktmanometer.

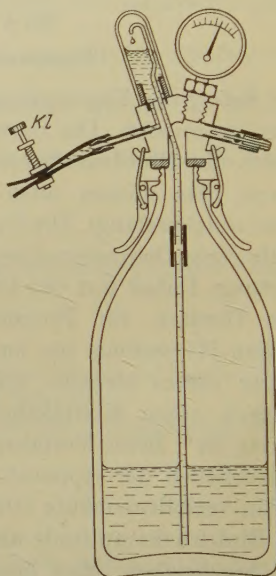


Abb. 2. Gegenstromapparat ohne Quecksilber.

reibungsarme, sicher leitende Verbindung gewährleistet. Der systolische Blutdruckanstieg löst die Berührung zwischen K_1 und K_2 . Der diastolische Abfall stellt den Kontakt wieder her. Die Amplitude braucht nur gering zu sein, da schon ein toter Gang von einigen Zehntelmillimetern ein sicheres Arbeiten gewährleistet. Größere Amplituden schaden nicht, da K_2 diese Bewegungen mitmacht. Auch die Änderungen der mittleren Blutdruckhöhe werden durch das Mitgehen von K_2 kompensiert. Die Auf- und Abwärtsbewegungen des Schwimmers werden nicht nennenswert behindert, ebensowenig die Drehbewegungen um die senkrechte Achse. Das Manometer kann daher weiter zur Registrierung des Blutdruckes verwendet werden. Der Kontakt ist, da er sich in einem gekapselten Raum befindet, gegen Verschmutzung gut geschützt. Zwischen der Übertragungsflüssigkeit des Manometers und dem Quecksilber ist zwecks elektrischer Isolierung des Versuchstieres eine Schicht von dünnflüssigem Mineralöl eingeschaltet.

In Verbindung mit dem Kontaktmanometer wurde eine *Gegenstromapparat* eigener Konstruktion benutzt, die ohne Quecksilber arbeitet.

Sie besteht aus einer 1 Literflasche (DIN), die einen leicht abnehmbaren Verschluss erhielt. Die Oberseite dieses Verschlusses ist als stumpfwinkliges Dach

ausgebildet. Auf der einen Dachfläche ist ein kleines Manometer angebracht. Die andere trägt ein Schauglas zur Kontrolle der in Tropfen dort durchfallenden Sodalösung. An der Seitenfläche der Verschlusses unterhalb des Manometers befindet sich ein Fahrradventil, auf der Gegenseite der Abflußstutzen für die Sodalösung. Zum Versuch wird die Flasche mit etwa 300 cm³ Sodalösung gefüllt und der Druck in dem darüber befindlichen Luftraum auf 1,5 Atü gebracht.

2. Ordinatenschreiber.

Die uns bekannten Formen des Ordinatenschreibers genügten unseren Ansprüchen nicht. Weitgehende Geräuschlosigkeit schien uns für länger dauernde Versuche dringend erforderlich zu sein. Der Platzbedarf vor der Kymotrommel sollte möglichst gering, der Frequenzbereich groß und die Umschaltung auf die einzelnen Bereiche einfach sein. Die Ordinatenwerte der Frequenzbereiche sollten zueinander in einfachen Zahlenverhältnissen stehen. Der eingeschaltete Frequenzbereich sollte auf der Trommel durch eine Vorrichtung kenntlich gemacht werden, die mit der Umschaltung gekoppelt ist, um Irrtümer auf jeden Fall zu vermeiden. Der Steuerkontakt (Kontaktmanometer, Tropfenzähler o. ä.) sollte möglichst wenig elektrisch belastet werden, um Dauerversuche ohne Schwierigkeiten durchführen zu können. Neben dem Netz sollten keine anderen Stromquellen (Batterien) notwendig sein. Die geschriebene Ordinate mußte unabhängig gemacht werden von der Öffnungs- bzw. Schließungsdauer des Steuerkontaktes. Außerdem sollte das Gerät auch in horizontaler Lage (vor dem Schlitz eines optischen Kymos) funktionieren.

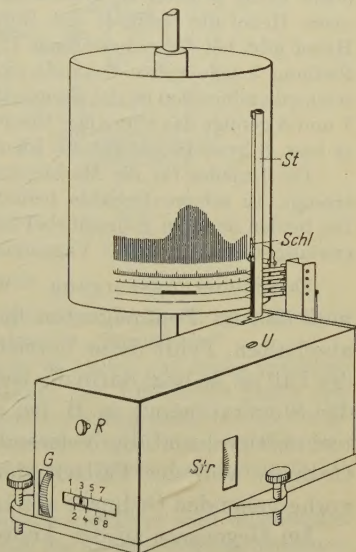


Abb. 3. Ordinatenschreiber und Mehrfachsignal.

Der in Abb. 3 skizzierte Ordinatenschreiber erfüllt diese Bedingungen. Er enthält, wie der von FLEISCH angegebene, einen von einem Motor über ein Unteretzungsgetriebe gedrehten Topfmagneten. Als Antrieb dient ein Grammophonlaufwerk, dessen Umdrehungszahl leicht durch die in einem Fenster sichtbare Stroboskopscheibe (*Str*) kontrolliert und mit Hilfe einer Stellschraube (*U*) nachreguliert werden kann. Die Scheibe wird durch eine Glimmlampe im Inneren des Apparates beleuchtet. Der Topfmagnet dreht einen 205 mm langen Hebel, dessen Ende über eine 140 mm lange Schubstange mit dem die Schreibspitze tragenden Schlitten (*Schl*) verbunden ist. Das Profil des Leichtmetallhebels ist in einem Teil seiner Länge T-förmig, damit er großflächig auf gut dämpfendem Material aufschlagen kann, ohne die Nulllinie zu verändern. Der Schlitten besteht aus zwei kreuzweise miteinander hart verlöteten Stahlkanülen. Er wird geführt mit Hilfe

einer 7 mm starken Stahlstange (*St*) und zwei in passenden Abständen dazu parallel gespannten Drähten (*V2a* — 0,4 mm). Die Führung samt Schlitten kann bei Nichtgebrauch in das Gehäuse geklappt werden. Das Gehäuse kann nach Lösen einer Rändelschraube (*R*) abgenommen werden.

Das Getriebe hat 8 Stufen. Es wird durch Drehen des Rades *G* eingestellt und erlaubt Steigegegeschwindigkeiten der Schreibspitze von 160 bis 1,25 mm pro Sekunde. Das Verhältnis zwischen benachbarten Frequenzbereichen ist jeweils 1:2.

Die Markierung des eingestellten Frequenzbereiches auf der Kymotrommel erfolgt durch die beiden oberen Schreibhebel eines Mehrfachsignals, das ebenfalls im Hinblick auf geringen Platzbedarf neu konstruiert wurde. Es enthält in einer U-Schiene untereinander 4 Magnete. Die Schreibhebel können dadurch auf kleinem Raum am oberen Ende der U-Schiene untergebracht werden (vgl. Abb. 3). Der obere Hebel arbeitet als Dekadenschreiber. Die Markierung geschieht so, daß der obere Hebel die Sekunde mit Heraushebung jeder zehnten schreibt. Der zweite Hebel gibt bei Getriebestellung 1 jede Sekunde, bei Stellung 2 jede zweite, bei Stellung 3 jede vierte Sekunde ein Zeichen usw. Aus der so entstehenden Zeitzeichenkombination ist der Frequenzbereich leicht abzulesen. Bei Getriebestellung 6, 7 und 8 genügt das einmalige Erscheinen des unteren Zeitzeichens, da seine Dauer (4 bzw. 8 bzw. 16 sec) für die Identifizierung des Frequenzbereiches genügt.

Die Impulse für die Markiermagneten werden vom Ordinatenschreiber selbst erzeugt. In seinem Gehäuse befindet sich auch der erforderliche Transformator. Die beiden anderen Schreibhebel können für weitere Markierungen, die ja zumeist erwünscht sind (z. B. bei Vagusreizung), benutzt oder aber abgenommen werden.

Der Steuerungsvorgang — wir benutzen immer die Kontaktöffnung — muß den im Topfmagneten fließenden Strom stets für die gleiche Zeit abschalten. Fehlt diese Vorrichtung, wie das bei einigen Ausführungen der Fall ist, so liegt darin die Gefahr der Ungenauigkeit bei schneller Folge der Steuervorgänge (z. B. bei den Pulsfrequenzen der üblichen Laboratoriumstiere) und die Notwendigkeit eine Eichkurve anzulegen, da jede Ordinate von der Fallzeit der Schreibvorrichtung aus der Höhe der vorhergehenden Ordinate abhängig ist.

Im Gegensatz zu der Anordnung von FLEISCH erreichen wir die Abschaltung auf rein elektrischem Wege — und damit lautlos — durch ein Vorschaltgerät¹, das man wohl am besten als „Zeitschaltrelais“ bezeichnet.

Nur die Öffnung des bei *K* angeschlossenen Steuerkontaktes bewirkt die Unterbrechung des Stromflusses in dem bei *M* angeschlossenen Magneten. Die Schließung des Kontaktes ist ohne Wirkung. Auch die Zeitspanne, die der Kontakt geöffnet bleibt, ist ohne Einfluß auf die Abschaltzeit des Magneten, die jeweils 0,1 sec beträgt.

Die Eichung des Zeitschaltrelais ist einfach. Zu diesem Zweck wird *K* mit dem Sekundenkontakt des Ordinatenschreibers verbunden. Der veränderliche Widerstand 4 in Abb. 4 wird dann so eingestellt, daß die geschriebene Ordinate 9/10 der am Getriebe eingestellten Steighöhe erreicht — z. B. 72 mm bei Stellung 2.

Die Bezeichnung Relais beinhaltet, daß der Strom im Steuerkreis wesentlich kleiner ist als im Arbeitskreis (Magnet). Dies ist auch der Fall. Die Stromstärken betragen 2 bzw. 30 MA. Damit ist auch die eingangs geforderte geringe elektrische Belastung des Steuerkontaktes erfüllt.

¹ Anmerkung bei der Korrektur: Das Zeitschaltrelais wurde inzwischen soweit verkleinert, daß es im Gehäuse des Ordinatenschreibers mit untergebracht werden konnte.

Die Schreibspitze beschreibt mit Hilfe ihrer Führung eine gerade Linie, der mit ihr verbundene Hebel dagegen an seinem Ende einen Kreisbogen. Da das Hebelende in gleichen Zeiten gleiche Strecken auf dem Kreisbogen zurücklegt, kann die Schreibspitze nicht — was eigentlich erreicht werden sollte — in gleichen Zeiten gleiche Strecken auf einer geraden Linie zurücklegen. Bei einer Länge des Hebels von 205 mm und einer Begrenzung der Ordinatenhöhe auf max. 80 mm kann man jedoch auf eine Eichskala verzichten und die Ordinatenhöhe einfach in Millimeter ablesen. Die so gemessene Ordinate weicht max. nur 0,12 mm vom theoretisch zu fordernden Wert ab. Natürlich muß man, um proportionale Werte zu erhalten,

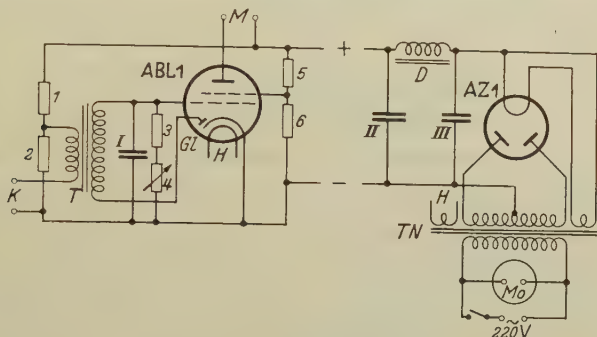


Abb. 4. Zeitschaltrelais.

der gemessenen Ordinate jeweils 10% der eingestellten Steighöhe pro Sekunde zuaddieren. Diese 10% werden ja vom Zeitschaltrelais „verschluckt“.

Mit Hilfe eines passenden Lichtzeigers gelingt es leicht, auf einem optischen Kymo Kurven zu bekommen, die in ihren Maßen den Rußkurven genau entsprechen. Die Schreibspitzenführung für die Rußschreibung kann bei Lichtregistrierung eingeklapppt werden. Durch einen kleinen Kunstgriff können unter Ausnutzung der gleichen Lichtquelle auch die Zeichen des Mehrfachsignals in Lichtzeichen verwandelt werden.

Als Nachteil der Aufzeichnungen eines Ordinatenschreibers wird es bisweilen besonders bei Lichtregistrierung empfunden, daß die aufgezeichneten Ordinaten einen großen Teil der Papierfläche einnehmen. Eine Vorrichtung, die nur den Fußpunkt und Gipfel jeder Ordinate als Lichtpunkt markiert, ist in Ausarbeitung. Sie arbeitet mit einer Beleuchtung, die analog den seit einiger Zeit in der Photographie gebräuchlichen Elektronenblitzen gebaut ist.

Zusammenfassung.

Es wird ein Ordinatenschreiber und ein Kontaktmanometer beschrieben, die es erlauben, im Blutdruckversuch ohne weitere Maßnahmen die Herzfrequenz zu registrieren. Als zweckmäßige Zusatzgeräte erwiesen sich ein Mehrfachsignal mit geringem Platzbedarf und eine Gegenstromapparatur ohne Quecksilber.

Die technische Ausführung der Geräte sowie die Entwicklung des Zeitschaltrelais erfolgte durch Herrn Rundfunkmechanikermeister W. SCHWAMM, Wolbeck.

Literatur.

FLEISCH, A.: Z. exper. Med. **72**, 384 (1930). — GENUIT u. RUPPERT: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 684 (1942/43).

Doz. Dr. med. habil. H. GENUIT, Hamm (Westf.), Viktoriaplatz 12.

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. H. HELLNER).

Verteilung, Resorption und Ausscheidung nach wiederholter oraler Gabe von Conteben.

II. Mitteilung.

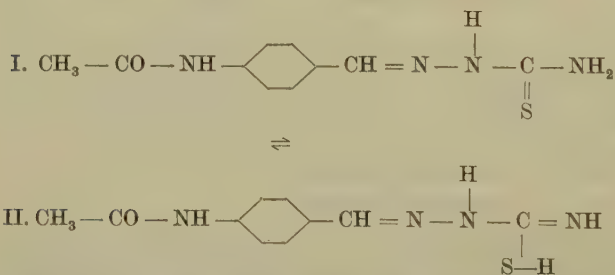
Von

K. HINRICHS, H. POPPE, H. STEYER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Juli 1953.)

Eine frühere Mitteilung in dieser Zeitschrift (HINRICHS, POPPE und STEYER [2]) berichtet über die Verteilung, Absorption und Ausscheidung eines mit S^{35} radioaktiv etikettierten Conteben-Moleküls (4-Acetylaminobenzaldehyd-thiosemicarbazon) im Meerschweinchenorganismus nach einmaliger Gabe von 100 mg Conteben. Die Ergebnisse wiesen auf eine erhebliche Rolle der Nebennierenrinde im Sinne einer Speicherung des Medikamentes oder doch wesentlicher Teile des Moleküls in diesem Organ, als Ausdruck einer aktiven Beteiligung am Stoffwechselgeschehen des Conteben hin. Solche Befunde und die bisherigen klinischen Erfahrungen (HEILMEYER [1—3]; HINRICHS, POPPE und STEYER [2]) sind nur deutbar, wenn dieses Thiosemicarbazon in seiner C-S-Bindung in Lösung als Gleichgewicht zweier tautomerer Formen:



vorliegt. An anderer Stelle wurde auf diese Problematik hingewiesen (HINRICHS, POPPE und STEYER [2]).

Die Fülle der auftauchenden Fragen des Verhaltens von Conteben im Organismus forderte weitere Untersuchungen, wobei in dieser Mitteilung im wesentlichen zur Verteilung, Resorption und Ausscheidung nach protrahierter Gabe von Conteben, sowie zu einer Gegenüberstellung mit einem möglichen Abbauprodukt, dem Thioharnstoff, Stellung genommen werden soll.

Es wurden in diesem Zusammenhang 35 ausgewachsene Meer-schweinchen (19 ♂ + 16 ♀) (Gesamtgewicht 400 g im Mittel) untersucht. Im einzelnen wurden 401 Organbestimmungen durchgeführt.

Methodik.

Alkalische Verseifung abgewogener Organmengen im Nickeltiegel mit KOH 60%.

Einschmelzen des Breies in Soda-Salpeter-Schmelze ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{KNO}_3$ Sicc.).

Anschließende Fällung des S in saurem Milieu mit BaCl_2 als Bariumsulfat auf einem Kieselgur gehärteten Rundfilter (3 cm Durchmesser) (Schleicher & Schüll, Nr. 287).

Auf Grund der bisherigen Erfahrungen genügt die Annahme einer gleichmäßigen Filterdicke nicht, da die Voraussetzung eines annähernd gleichen Schwefelgehaltes der untersuchten Organe und das Arbeiten mit fast gleichen Quantitäten im chemischen Aufbereitungsprozeß nicht erfüllt sind.

Diese Tatsache wurde in unserer ersten Mitteilung noch nicht berücksichtigt (HINRICHS, POPPE und STEYER [1])! Bei einer genauen Durchsicht der früheren Meßergebnisse sind jedoch wesentliche Abweichungen nicht vorhanden, da immer in die Werte der gleiche Fehler eingeht, andererseits die Daten der einzelnen Organwerte nur Relativzahlen, also eine prozentuale Angabe, bedeuten.

Bei quantitativen Untersuchungen muß die verschiedene Filterdicke jedoch berücksichtigt werden. Das viel einfachere Verfahren des Arbeitens mit „gesättigten“ Schichten ist für Indicatoruntersuchungen dieser Art nicht so sehr geeignet, da sich an sich nur geringe Zählimpulse (unter 100 Imp./min) ergeben und somit exakte Vergleiche erschwert sind.

Aus diesem Grund wurde die Filterdicke eines jeden Präparatfilters im trockenen Zustand vor der Bariumsulfat-Fällung und mit Schicht auf der Analysenwaage bestimmt, und damit die Niederschlagsmenge in Milligramm/Quadrat-zentimeter festgelegt.

Im Durchschnitt ergaben sich Filterdicken von 3,6 mg/cm² bei Schwankungen von $\pm 50\%$!

Bestimmung der Selbstabsorption für S^{35} .

Die Grenzsicht bei Elektronenstrahlen für S^{35} mit einer E_β max. von 0,168 MeV. ist von KOHLRAUSCH für bestimmte Schichtdicken angegeben. Die Vielfachen dieser Grenzsichtenergie ermöglichen einen Rückschluß auf die Schichtabsorption.

Zum Beispiel: Schichtdicke 3,2 mg/cm²; E_β Grenze für 3,2 mg/cm² $4,0 \times 10^{-2}$ MeV., also $\frac{0,168}{0,04} = 4,45$; danach beträgt die prozentuale Durchlässigkeit einer Schicht von 3,2 mg/cm² für die Strahlung von S^{35} 38%.

Mit Hilfe dieser Absorptionskorrektur ist nun ein Absolutvergleich der einzelnen Filter ohne weiteres möglich.

Alle hier aufgezeichneten Organbestimmungen sind in dieser Weise nach Abzug des Null-Effektes des Zählrohres als Imp./min/g-Organ oder g-Ausscheidungsflüssigkeit dargestellt.

Mit Hilfe von Bestimmungen der spez. Aktivität/mg Conteben ist eine genaue quantitative Angabe aus den gemessenen Organaktivitäten möglich.

Soweit Aussagen über die chemische Form des Vorliegens von Conteben noch nicht gemacht werden können, mußte der Ausdruck mg-Äqv/Imp/min gebraucht werden.

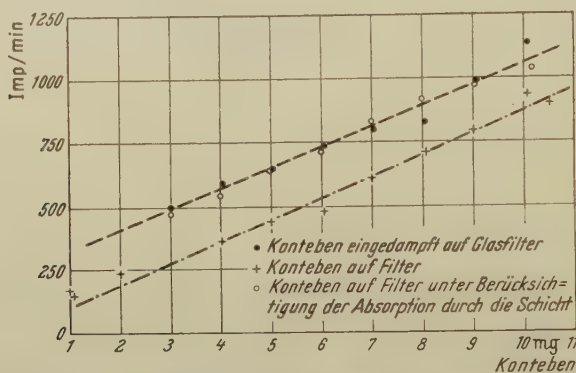


Abb. 1. Spez. Aktivität von S^{35} -Conteben nach der organüblichen Aufbereitung. Ordinate: Imp/min. Abszisse: mg/Äqv.-Conteben (dabei kann im vorliegenden Fall das mg/Äqv.-Conteben als mg Substanz gelten). Die Selbstabsorption der Filterniederschläge ist berücksichtigt. Zur Kennzeichnung des Einflusses der Selbstabsorption durch die Schichtdicke wurden für die kleinen Gewichte 5; 10; 20 mg Conteben auch die relativen Imp-Zahlen mit eingetragen. Die größeren Bariumsulfat-Niederschläge, die für die vollständige Fällung des Schwefels notwendig sind, erfordern teilweise Korrekturfaktoren in der Größenordnung von 2.

Ergebnisse.

In den nachfolgenden Kurven sind die Einzel- und Mittelwerte der Organaktivitäten von Tieren aufgetragen, denen 1—15 Tage lang je 100 mg Conteben durch eine Schlundsonde verabfolgt wurden. Jeweils 24 Std nach der letzten Tagesgabe wurden die Tiere getötet und die Organe aufgearbeitet.

Am Auffallendsten bei der Betrachtung der Kurven ist die schon früher beschriebene, relativ hohe Aktivität der Nebennieren (Abb. 2, l) und die hohen Werte des Darminhaltes (Abb. 3, r, s).

Die bereits ausgesprochene Ansicht, daß der größte Teil des oral verabreichten Contebens durch den Darm ausgeschieden wird, bestätigt sich hiermit.

Die geringsten Aktivitäten finden sich in Lunge, Herz, Genitalorganen, Knochen, Milz, Hirn, Nieren, Muskulatur von verschiedenen Körperpartien und Fettgewebe (Abb. 2, a, k, h, e, d, b, g).

Die Tatsache, daß in der jeweils gefundenen Galle überhaupt Aktivitäten nachgewiesen wurden, spricht dafür, daß ein Teil des resorbierten Contebens durch die Galle wieder ausgeschieden wird. Die genauen Ausscheidungsquoten sind aber nicht zu erfassen, da sich die Messungen nur

auf den, jeweils nach der Tötung des Tieres gefundenen Galleninhalt beziehen, somit keinen sicheren Schluß auf die Gesamtausscheidung in der Gallensekretion zulassen (Abb. 2, f).

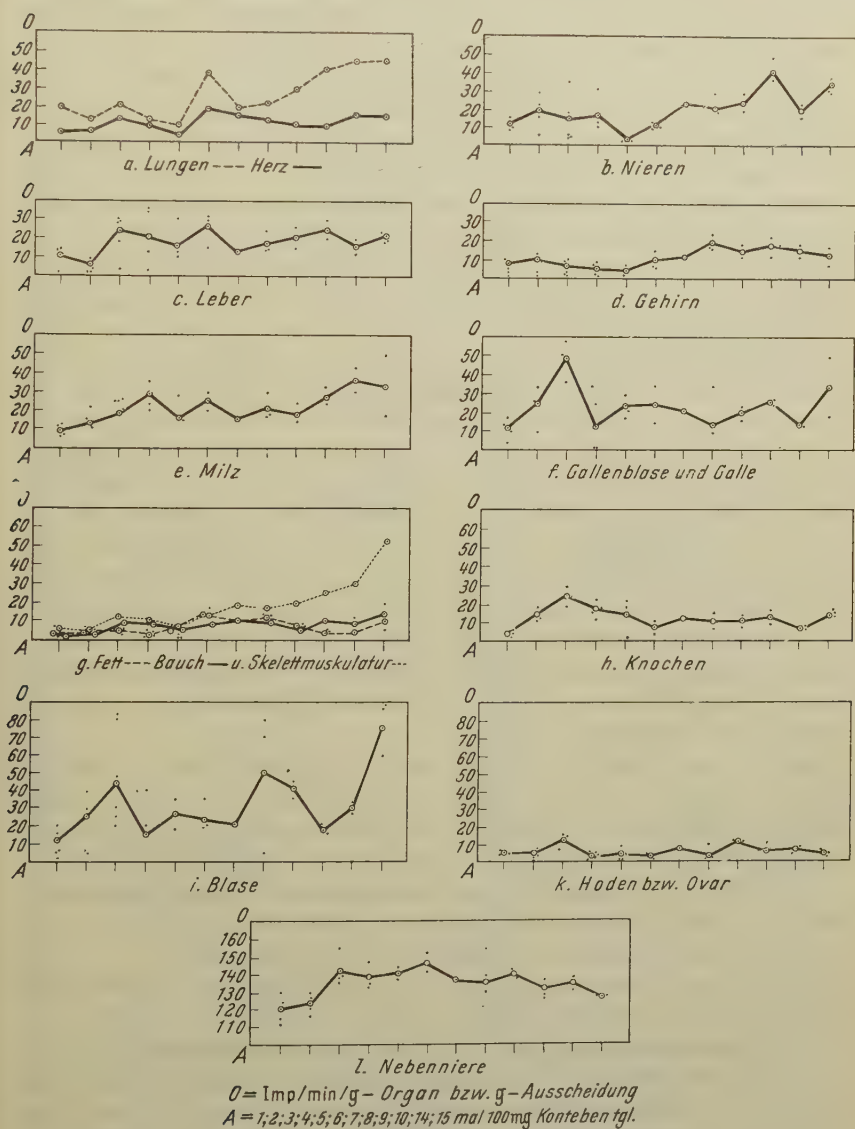


Abb. 2.

Höhere Werte wurden in den, vor der Verarbeitung gewaschenen, Resorptions- und Ausscheidungsorganen gemessen. Am auffallendsten ist

hier der Dünndarm. Getrennte Aufbereitung verschiedener Dünndarmabschnitte zeigte die höchste Konzentration im mittleren Dünndarmdrittel, was auf eine verstärkte Resorption durch die Darmwand an dieser Stelle schließen läßt. Allerdings bestehen hier geringe Fehlermöglichkeiten durch, selbst nach gründlichem Waschen nicht restlos zu entfernende Partikel des Darminhaltes, die bei dem subtilen Nachweisverfahren natürlich ins Gewicht fallen können. Unwahrscheinlich ist aber die Annahme des immer gleich großen Fehlers. Da die biologische Streuung bei insgesamt 103 Organbestimmungen, allein des Darmes, das normale Maß nicht übersteigt, glauben wir, einen hier allenfalls möglichen Fehler vernachlässigen zu dürfen, da er nur sehr gering sein kann.

Bei der differenzierten Untersuchung des Inhaltes des Magendarmkanals sowie des Urins ergaben sich wesentlich höhere Werte als in den Organen (Abb. 3, *m*, *n*, *o*, *u*, *v*).

Die im Urin gemessenen Aktivitäten an verschiedenen Tagen lassen erkennen, daß die Ausscheidung des Conteben im Urin weit hinter der Ausscheidung durch den Darm zurücktritt (Abb. 3, *u*, *v*, *r*, *s*, *t*). Es sind auch keine Anhaltspunkte für einen Anstieg bei fortlaufender peroraler Medikation zu gewinnen. Die angegebenen Werte der Aktivitäten in Imp/min/ml täuschen allerdings etwas über die absoluten Ausscheidungsquoten, da die Urinausscheidung in g gemessen, die Kotausscheidung, gemessen in g/Tg., übersteigt. Es ist hier zu bemerken, daß die Urinaktivitäten nicht absolut verwertet werden können. Es gelingt im Tierversuch nicht immer bei länger dauernden Versuchen, in jedem Fall Kot und Urin sauber voneinander zu trennen, da ein Teil des Kotes auch bei feinen Maschennetzen durchfällt und sich im Urin auflöst, so daß seine Aktivität dort mitbestimmt wird.

Alle in den Kurven aufgezeichneten Zahlenwerte geben nun freilich keinen Aufschluß über die chemischen Veränderungen, die im metabolischen Stoffwechsel auftreten. Die quantitativen wie qualitativen Daten lassen jedoch gewisse Rückschlüsse über die möglichen Formen zu.

Interessant in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von SHULMAN und KEATING mit S^{35} -etikettiertem Thioharnstoff, einem auch für Conteben zu diskutierenden, möglichen Abbauprodukt.

Wir haben in einer Vergleichsserie von 10 Tieren ebenfalls mit einem S^{35} -etikettierten Thioharnstoff diese Ergebnisse überprüft.

Als bemerkenswertes Moment dieser Untersuchungsreihe fällt die hohe Ausscheidungsquote des Thioharnstoff im Urin auf. 58% des intraperitoneal applizierten Thioharnstoffsalzes werden innerhalb der ersten 48 Std p. a. auf diese Weise ausgeschieden. Nur 34% verlassen den Organismus mit dem Kot. (Die gebrachten Prozentzahlen entsprechen Mittelwerten der Ausscheidung von 10 Tieren und stimmen mit den Ergebnissen von SHULMAN und KEATING genau überein.)

Diese bedeutenden quantitativen Unterschiede zur Ausscheidungsart des Conteben lassen wohl den Schluß zu, daß oral appliziertes Conte-

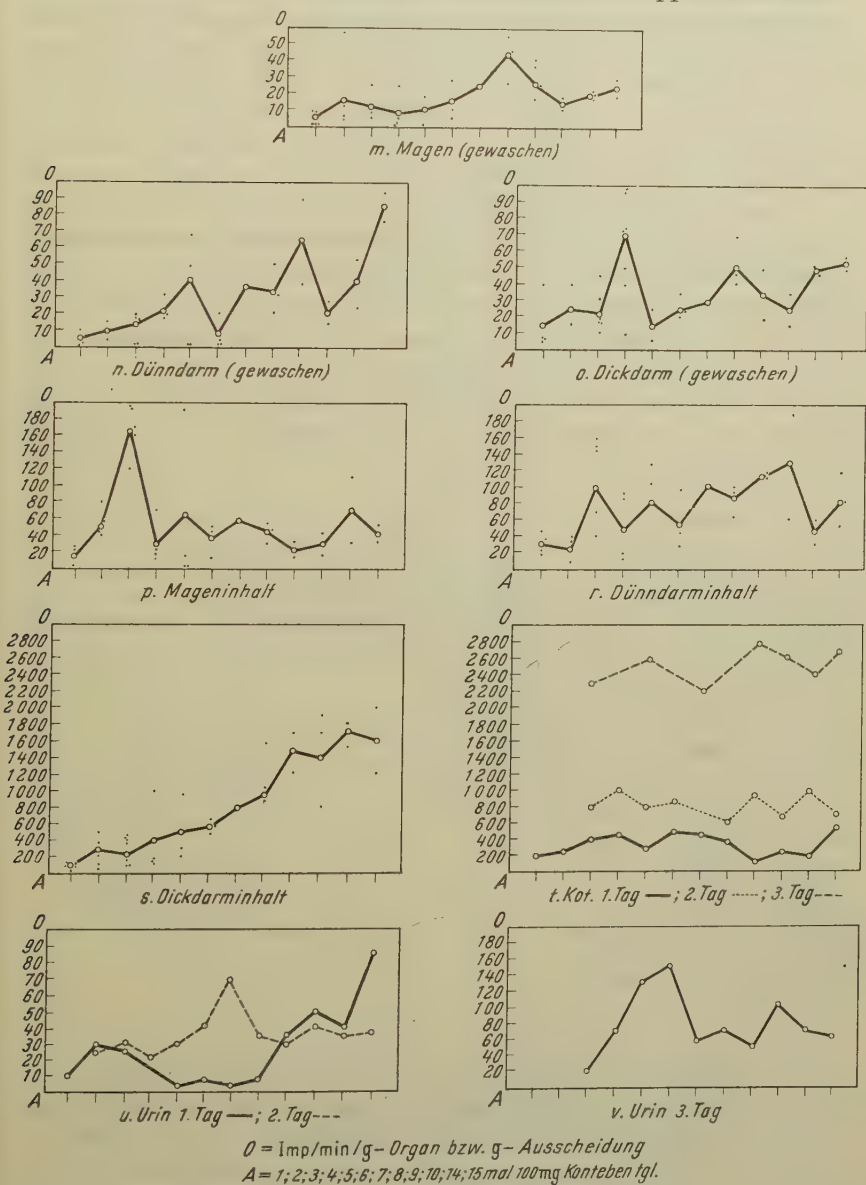


Abb. 3.

ben nicht in überwiegender Menge im Fall seines Abbaues durch den Organismus zu diesem möglichen Endprodukt umgewandelt wird.

Auch die Gegenüberstellung der einzelnen Organwerte läßt teilweise recht erhebliche Unterschiede erkennen. In Übereinstimmung mit den vorgenannten Autoren fanden wir z. B. folgende prozentuale Verteilung:

Schilddrüse	3	%
Leber	0,2	%
Milz	0,2	%
Nieren	0,4	%
Nebennieren	0,25	%

Ein bedeutender Unterschied in der Organverteilung unter Bevorzugung der Nebennieren wie in den Conteben-Versuchsreihen läßt sich somit nicht erkennen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt im Vergleich dazu die absolute Verteilung von Conteben im Organismus, gemessen in mg-Äqv.-Conteben.

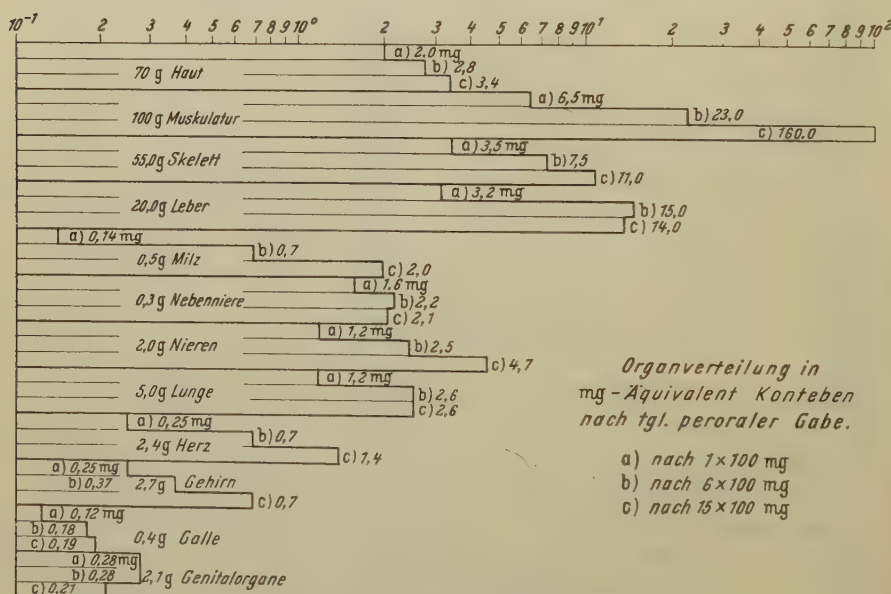


Abb. 4.

Bei dieser Zusammenstellung zeigt sich das bedeutende Speichervermögen von Haut und Muskulatur, während von den Organwerten die Leber im Stoffwechselgeschehen die bedeutendste Rolle spielt (Abb. 4).

Die innerhalb der Säulen dargestellten Organgewichte stellen Mittelwerte von Meerschweinchenorganen dar, die aus Wägungen bei 35 Tieren gewonnen wurden. Die in Milligramm angegebenen Äquivalente Conteben sind gleichfalls als Mittelwerte von 35 Tieren berechnet. Die Werte auf der Abszisse (insgesamt 400 Organbestimmungen) sind als Mittelwerte logarithmisch aufgetragen.

Zusammenfassung.

An Hand von 401 Organbestimmungen wurden nach wiederholten oralen Gaben eines im Schwefelatom radioaktiv etikettierten Contebenmoleküls von jeweils 100 mg täglich, während 1—15 Tagen mit Hilfe des radioaktiven Nachweises durch ein GEIGER-MÜLLER-Zählrohr die Resorption, die Verteilung und die Ausscheidung untersucht. Gleichzeitig wurde an Hand quantitativer Untersuchungen mit einem radioaktiv etikettierten Thioharnstoff ein Vergleich zu diesem möglichen Abbauprodukt des Contebens im Körper gebracht. Die Ergebnisse weisen auf eine unterschiedliche Verteilung der beiden Stoffe hin und lassen somit den Schluß zu, daß wesentliche Mengen Conteben in der abgebauten Form nicht als Thioharnstoff im Körper während einer 15tägigen Beobachtungsperiode auftreten. Die einzelnen Organverteilungen unterstreichen die bedeutsame Rolle von Haut, Muskulatur und Skelettsystem als Speicherungsorgane für Conteben und seine möglichen Abbauprodukte. Mit Hilfe der genannten Technik ist es somit erstmalig möglich, exakte Angaben über die Verteilung von Conteben in den einzelnen Organen zu machen.

Literatur.

HEILMEYER, I., u. L.: [1] *Klin. Wschr.* **1949**, 790. — [2] *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **210**, 424 (1950); [3] **211**, 313 (1950). — HINRICHS, K., H. POPPE u. H. STEYER: [2] *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **21**, 193 (1953). — [3] *Klin. Wschr.* **1953** (im Druck). — KOHLRAUSCH: zit. von FASSBENDER, H.: *Strahlenther.* **82**, 387 (1950). — SHULMAN, J., and R. KEATING: *J. of Biol. Chem.* **183**, 215 (1950).

Priv.-Doz. Dr. K. HINRICHS, Chirurgische Univ.-Klinik, Göttingen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. LOESER).

Diäthylenglykol.

Neuere Beiträge zur Pharmakologie und Toxikologie der Polyglykole.

Von

ARNOLD LOESER.

In Zusammenarbeit mit

G. BORNMANN, L. GROSSKINSKY, G. HESS, R. KOPF, K. RITTER, A. SCHMITZ,
E. STÜRMER und H. WEGENER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Juli 1953.)

I. Einleitung.

Diäthylenglykol kann als Anfangsglied der homologen Reihe der Polyglykole aufgefaßt werden, wobei unter Polyglykolen Ketten von ätherartig verknüpften Glykol-Molekülen zu verstehen sind. Es ist aufgebaut aus zwei solcherweise verbundenen Äthylenglykol-Molekülen und hat die Zusammensetzung



Dieser schon lange Jahre zugängliche Äther-Alkohol ist seit 1931 Gegenstand zahlreicher pharmakologischer und toxikologischer Untersuchungen gewesen, die vorwiegend in den USA durchgeführt worden sind.

Erste experimentelle Ergebnisse³², aus welchen eine recht geringe akute Toxizität von Diäthylenglykol hervorging, legten den Gedanken an eine breitere Anwendung nahe. Nachdem aber HANZLIK u. Mitarb.¹² gezeigt hatten, daß im Tierversuch die Giftigkeit einer mit Diäthylenglykol hergestellten Wismutzubereitung größer war als die Toxizität einer entsprechenden Zubereitung mit Äthylenglykol, und vor allem, nachdem die Massenvergiftung, welche nach Anwendung eines Sulfanilamid-Diäthylenglykol-Elixiers bei einer ganzen Reihe Kranker eingetreten war, ursächlich auf den Bestandteil Diäthylenglykol bezogen wurde (CANNON, GEILING u. a., s. TAEGER), erhielt Diäthylenglykol den Stempel „hochgiftig“; seine Anwendung beim Menschen schien als fehlerhaft gelten zu müssen.

Andererseits wurden in Versuchen an Tieren, vor allem bei vergleichenden Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Glykole wiederholt bestätigt, daß die akute Giftigkeit von Diäthylenglykol relativ gering ist^{9, 20, 26, 35}. In chronischen Versuchen zeigte sich hingegen, daß unter bestimmten, meist extremen Bedingungen — z. B. bei Verabfolgung von Diäthylenglykol im Futter, von verdünnten Diäthylenglykol-Lösungen als einzigem Flüssigkeitsangebot an Ratten^{10, 18} vgl. ^{19, 30} oder von Kunstfetten, in denen statt Glycerin Diäthylenglykol mit Fettsäuren verestert war²³ — die Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere nicht viel geringer war als etwa durch Äthylenglykol. Auch nach

Aufbringen auf die Haut riefen beide Verbindungen in einigen Versuchen (HANZLIK¹⁵, DOERR), deren Ergebnis übrigens FORST⁶ nicht reproduzieren konnte, resorptive Schäden hervor.

Neben Erscheinungen, die für eine toxikologische Unbedenklichkeit des Diäthylenglykols sprachen, wurden also solche beobachtet, die als „Schönheitsfehler“ galten und die Beurteilung im negativen Sinne beeinflussen mußten.

Zwei eigene Versuche ließen gewisse Zweifel an der Richtigkeit der angenommenen besonderen Giftigkeit von Diäthylenglykol und an der allgemeinen Gültigkeit einer derartigen Einstufung aufkommen. In einer vergleichenden Toxizitätsbestimmung zeigte sich nämlich, daß bei Mäusen ein aus Sulfanilamid und Glycerin bereitetes Elixier in demselben Dosenbereich akut tödlich wirkte wie ein entsprechendes Elixier aus Sulfanilamid und Diäthylenglykol. Weiterhin ergab sich aus Tierversuchen, die der Frage einer Verwendbarkeit von Diäthylenglykol als Feuchthaltemittel für Tabak nachgingen, daß unter bestimmten, allerdings auch recht extremen Bedingungen Diäthylenglykol als ebenso unbedenklich anzusehen war wie Glycerin²⁵. Diese Auffassung steht nicht nur mit den Versuchsergebnissen in Einklang, die 1937 von HAAG⁸ über die gleichen Fragen mitgeteilt wurden, sondern stimmt auch mit den praktischen Erfahrungen in den USA überein, wo es üblich ist, Zigarettentabak an Stelle von Glycerin mit Diäthylenglykol als Feuchthaltemittel zu präparieren.

Nach dem Gesagten schien es notwendig, zu prüfen, unter welchen Bedingungen Diäthylenglykol Giftwirkungen, die seine Anwendung verbieten würden, auslösen kann, und unter welchen Bedingungen derartige Effekte fehlen. Die Notwendigkeit einer neuerlichen Prüfung ergab sich auch aus dem Umstand, daß die in früheren Versuchen ermittelten toxischen Dosen selbst da, wo sie unter vergleichbaren Bedingungen gewonnen waren, recht unterschiedlich ausfielen, und aus der naheliegenden Folgerung, daß Unterschiede in der Qualität des in den einzelnen Untersuchungen verwendeten Diäthylenglykols bestanden haben mögen. Schließlich erschien eine eingehende Untersuchung des Diäthylenglykols auch deshalb wünschenswert, weil ihm als dem einfachsten Vertreter der in zunehmendem Maße bedeutungsvollen Gruppe der Polyglykole ein beträchtliches Interesse zukommt.

Das in den folgenden Versuchen verwendete Diäthylenglykol* war praktisch farb- und geruchlos und wies folgende physikalisch-chemischen Daten auf: Brechungsindex n_D^{20} : 1,4465; spez. Gew. bei 20/4°: 1,1162; Siedebereich bei 760 mm Hg: 242,4—244,9°; Hydroxylzahl: 1050; Wassergehalt: 0,1%; Aschegehalt: 0,00%; Verunreinigungen an Cl, Fe, reduzierenden Stoffen und dergleichen nicht nachweisbar.

* „Diäthylenglykol rein“, Anorgana G. m. b. H., Gendorf; für die Überlassung der notwendigen Versuchsmengen Diäthylenglykol wird auch an dieser Stelle gedankt.

Zusätzlich wurden in gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen die Wirkungen von dem als praktisch ungiftig geltenden Glycerin untersucht. Die Ergebnisse sollten die Beurteilung der Diäthylenglykol-Versuche erleichtern und die Einordnung ihrer Resultate ermöglichen.

II. Beobachtungen am intakten Tier.

Ebenso wie andere mehrwertige Alkohole²⁴ wirkt auch Diäthylenglykol, in hohen Dosen gegeben, bei Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen *narkotisch*. Etwa 10—20 min nach oraler oder subcutaner Verabreichung subletaler Mengen werden die Versuchstiere müde und schläfrig, nehmen Bauchlage ein, verlieren ihren Tonus und zeigen beschleunigte Atmung. Noch größere Dosen bewirken eine tiefere Narkose, die Tiere bevorzugen Seitenlage, die Reflexe schwinden und schließlich tritt der Tod infolge Atemlähmung ein. Nur in Ausnahmefällen kommt es zu einem Excitationsstadium vor dem Tode vgl. ¹¹. Die *mittleren tödlichen Dosen* für Maus und Ratte (LD 50, 24 Std) nach KÄRBER, bestimmt an nahezu 500 Tieren, berechnet nach BURN³, gehen aus Tab. 1 hervor.

Tab. 1. Vergleich der Toxizität von Diäthylenglykol und Glycerin bei Maus u. Ratte (LD 50, cm³/kg, 24 Std).

Substanz	Maus		Ratte	
	per os	subcutan	per os	subcutan
Diäthylenglykol. . . .	25,23	20,16	25,70	18,06
Glycerin, wasserfrei . .	20,71			
Glycerin DAB VI* . .	30,21	10,78	46,72	16,69

* Glycerin DAB VI enthält 83—87% (im Mittel 85%) Glycerin. Die das Glycerin betreffenden Angaben sind der Arbeit FISCHER, L., R. KOPF, A. LOESER u. G. MEYER: Z. exper. Med. **115**, 26 (1949) entnommen.

Wie ein Vergleich der toxischen Dosen von Diäthylenglykol und wasserfreiem Glycerin zeigt, ist die mittlere tödliche Dosis für Diäthylenglykol größer, d. h. seine Giftigkeit geringer, jedenfalls bei einer 24stündigen Beobachtungszeit. Während aber für Tiere, die Glycerin erhalten hatten, im allgemeinen innerhalb eines Tages die endgültige Entscheidung über den Ablauf der Vergiftung gefallen ist, vergehen für die unter der Einwirkung von Diäthylenglykol stehenden Ratten unter Umständen mehrere Tage bis zur Erholung oder zum Tode. So wurde beispielsweise festgestellt, daß die niedrigste geprüfte Dosis Diäthylenglykol (16 cm³/kg per os), welche innerhalb von 24 Std von allen 10 Versuchstieren überlebt wurde, in der folgenden Woche noch zum Tode von 2 Ratten führte; bei den übrigen, im Verlauf der Toxizitätsbestimmung gegebenen Mengen (20, 24, 28, 32, 36, 40 und 44 cm³/kg), die in zunehmendem Grade auch innerhalb 24 Std tödlich wirkten, überstand nur ein Tier die 8tägige Beobachtungszeit.

Ähnlich wie nach parenteraler Zufuhr von Glycerin erscheint auch nach Injektion von Diäthylenglykol ein *roter Farbstoff im Harn*, der bei der spektroskopischen Untersuchung die typischen Hämoglobin-Banden zeigt. So wird nach subcutaner Verabreichung der mittleren tödlichen Dosis bei Mäusen und Ratten — gleiche Mengen wurden auch Meer-schweinchen und Kaninchen mit dem gleichen Erfolg injiziert — eine Hämoglobinurie beobachtet. Sie ist auch dann deutlich, wenn Ratten die der LD 50 entsprechende Menge Diäthylenglykol als 20%ige wäßrige Lösung subcutan erhalten. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß Diäthylenglykol, per os gegeben, ebenso wie Glycerin keine Hämoglobinurie auslöst (Mäuse, Ratten, Kaninchen).

Bei Hämolyseversuchen *in vitro* wurden Diäthylenglykol und Glycerin als 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5 und 1,25%ige wäßrige Testlösungen verwendet; zu 5 cm³ Testlösung wurde jeweils 1 Tropfen Blut — je eine Versuchsreihe mit Blut von Mensch, Ratte, Kaninchen und Katze — gegeben. Der Effekt wurde 30 min, 1, 2, 3, 6 und 24 Std nach Zusatz des Blutes abgelesen. In diesen Versuchen trat bei hohen Diäthylenglykolkonzentrationen die Auflösung der roten Blutkörperchen etwas schneller ein als bei entsprechenden Konzentrationen Glycerin; ein Unterschied war jedoch nach 2 Std nicht mehr zu erkennen. Auffällig blieb dann lediglich, daß der Versuchsansatz mit 80%igem Diäthylenglykol (bei Verwendung von Kaninchenblut auch der Ansatz mit 70%igem Diäthylenglykol) nach einiger Zeit trübe und flockig wurde.

Bekanntlich verursachen verschiedene ein- und mehrwertige Alkohole, per os zugeführt, eine Harnflut². Auch Diäthylenglykol besitzt eine deutliche *diuretische Wirkung*, welche sowohl bei Anwendung der unverdünnten Substanz als auch bei Einwirkung wäßriger Lösungen zum Ausdruck kommt. Ähnlich wie Äthylenglykol wirkte Diäthylenglykol bei Ratten (per os) stärker als Glycerin. Kontrolltiere, welchen statt Diäthylenglykol (unverdünnt) entsprechende Mengen Aqua dest. oder physiologische Kochsalzlösung zugeführt waren, sonderten innerhalb 24 Std nur etwa 12—18% (5,0 cm³/kg Körpergewicht) bzw. 4—7% (10,0 cm³/kg Körpergewicht) der bei den Versuchstieren gefundenen Harnmengen ab. Auch nach parenteraler Zufuhr veranlaßte Diäthylenglykol eine beträchtliche, Glycerin eine mäßige Zunahme der Harnsekretion. So betrug die 24 Std-Harnmenge von 4 hungernden und durstenden Ratten, welchen unverdünntes Diäthylenglykol (5,0 cm³/kg Körpergewicht) intramuskulär verabreicht worden war, 75,0 bzw. 81,8 cm³, die Harnmenge von entsprechend mit Glycerin behandelten Tieren dagegen nur 27,7 cm³, während Kontrolltiere, die physiologische Kochsalzlösung (5,0 cm³/kg Körpergewicht) erhalten hatten, 10,6, 14,3 bzw. 5,0 cm³ Harn in 24 Std absonderten.

Pathologische *Harnbestandteile* traten weder bei Katzen nach 3 tägiger Behandlung (einmal täglich 2 cm³ 50%iger wäßriger Lösung je kg Körpergewicht per os), noch bei Hunden während und nach 14 tägiger Behandlung (einmal täglich 2 cm³ 50%iger wäßriger Lösung je kg

Körpergewicht per os) auf, insbesondere war keine Eiweißausscheidung (Kochprobe, Sulfosalicylsäureprobe), keine Zuckerausscheidung (Probe nach NYLANDER und TROMMER), keine Veränderung des Sedimentes festzustellen.

Die Frage einer *Ausscheidung* von Diäthylenglykol mit dem *Harn* wurde vorwiegend an Ratten geprüft. Zum qualitativen Nachweis diente die von REIF für Äthylenglykol angegebene β -Naphtholreaktion; sie zeigt einen Gehalt von 0,1% Diäthylenglykol und mehr durch Rotfärbung²⁹ an. Gleichgültig, ob Diäthylenglykol (0,5—1,0 cm³/100 g Körpergewicht) oral oder subcutan zugeführt worden war, wurde die 2 Std später im Sammelharn der Ratten ausgeführte β -Naphtholprobe stets positiv und blieb es für weitere Stunden. Ein grundsätzlich gleiches Ergebnis hatten in entsprechender Weise angelegte Versuche mit Meerschweinchen. Einschränkend muß hervorgehoben werden, daß die β -Naphtholprobe nicht ein spezifischer Nachweis für Diäthylenglykol ist, sondern möglicherweise auch auf Umwandlungsprodukte dieses Äther-Alkohols anspricht. Bei Kontrolltieren, welche statt Diäthylenglykol gleiche Mengen Aqua dest. oder physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, fiel die REIFsche Probe immer negativ aus.

Auch in der *Gallenflüssigkeit* von Ratten und Meerschweinchen (Urethannarkose, Gallengangssonde; bei Meerschweinchen zusätzlich Gallenblase abgebunden) war die β -Naphtholprobe nach oraler oder subcutaner Zufuhr von Diäthylenglykol (1,0 cm³/100 g Körpergewicht) stets positiv. Der Gallefluß, d. h. die in der Zeiteinheit abgesonderte Gallenmenge wurde bei Ratten durch Diäthylenglykol (1,0 cm³/100 g Körpergewicht per os) nicht gesteigert.

Die *Körpertemperatur*, rectal mit Hilfe eines Thermoelementes (Meßfinger 4,8 cm lang) gemessen, blieb durch orale Zufuhr von 1,0 cm³ Diäthylenglykol bzw. 1,0 cm³ Glycerin DAB VI je kg Körpergewicht bei Kaninchen während 6 Std unbeeinflußt.

Organ	Histologischer Befund
Lunge und Herz:	Ohne Veränderungen;
Leber:	Einmal vacuolige Umwandlung der Leberzellen, sonst keine Besonderheiten;
Niere:	Dreimal Vacuolisierung der Epithelzellen in Hauptstücken und Schleifen; Epithelquellungen, in den Schleifen bis zu Epithelnekrosen;
Magen:	Fünfmal keine Veränderungen;
Milz:	Ohne Veränderungen;
Nebenniere und Schilddrüse:	Regelmäßig: Verkleinerung der Follikel mit Kernzerfall in den Follikelzentren;
	Ohne Veränderungen.

Bei der unmittelbar nach dem Tode vorgenommenen *Sektion* von Ratten (8 ♂, Gewicht 150—185 g), welche eine innerhalb von 24 Std tödlich wirkende Dosis Diäthylenglykol (44 cm³/kg) mit der Schlundsonde erhalten hatten, wurden abgesehen von einer mehr oder weniger ausgesprochenen Kleinheit der Milz keine Besonderheiten festgestellt. Ergebnis der biologischen Untersuchung* siehe S. 18.

III. Verhalten einzelner Organsysteme und Beobachtungen an isolierten Organen.

Der Wirkung von Diäthylenglykol am *Applikationsort* wurde in methodisch recht unterschiedlichen Versuchen nachgegangen.

An der *Haut* zeigten sich weder nach einmaligem, noch nach mehrfachem Auftragen sinnfällige Veränderungen, insbesondere fehlten Zeichen einer entzündlichen Reizung, Verätzung oder Verschorfung.

Es wurden je 5 mit Äthylurethan narkotisierten Ratten auf die geschorene Bauchhaut einmal 2 Std bzw. 2 Tage zweimal täglich für je 2 Std 25 cm³ Diäthylenglykol je Kilogramm Körpergewicht (annähernd die LD 50 Ratte oder Maus per os), je 5 nicht narkotisierten Meerschweinchen unter sonst gleichen Bedingungen einmal 2 Std bzw. 4 (verletzte Haut) oder 14 Tage (intakte Haut) zweimal täglich für je 2 Std 25 cm³ je Kilogramm Tier Diäthylenglykol aufgetragen. Nach 2 Std wurde die Substanz mit warmem Wasser entfernt und das Fell der Tiere mit Hilfe eines elektrischen Haartrockners getrocknet.

Ein gleiches Ergebnis hatten Versuche, in denen die Wirkung von unverdünntem Diäthylenglykol und zum Vergleich die von unverdünntem Glycerin (wasserfrei) auf die Schwanzhaut der Ratte in der von ENDERS und MOENCH⁵ beschriebenen Anordnung geprüft wurde. Nach Eintauchen der Rattenschwänze — 4 Tage, täglich 4 Std; 6 Tage, täglich 1 Std; 6 Tage, täglich 2 Std — zeigte die Haut der in Gruppen zu je 5 Ratten eingeteilten Tiere keinerlei Veränderungen.

Ebenso wie die äußere Haut wurden auch die *Schleimhäute* durch Diäthylenglykol nicht geschädigt. Nach Einträufeln von unverdünntem Diäthylenglykol in den Conjunctivalsack (Kaninchen, Hund, Katze) blieben sichtbare Veränderungen aus; Cornealreflex und Pupillenreaktion verhielten sich normal. Nach Aufbringen von Diäthylenglykol auf die Mundschleimhaut (Hund, Kaninchen, Ratte) waren keine entzündlichen Veränderungen oder sonstige Anomalien zu erkennen. Nach Eingabe der Prüfsubstanz in den Magen (Hund, Kaninchen) trat bei den Versuchstieren kein Erbrechen ein. Diäthylenglykol verhielt sich also wie Glycerin.

In den *Enddarm* appliziertes Diäthylenglykol verursachte ebenso wie Glycerin bei Ratten und Meerschweinchen eine beschleunigte Entleerung des Darminhaltes; beim Hund trat dieser Effekt nicht zuverlässig ein. Die Frage, ob die abführende Wirkung auf einer örtlichen Reizung beruht

* Für die Durchsicht der histologischen Präparate sprechen wir auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. GIESE, Pathologisches Institut der Städtischen Krankenanstalten Bremen, unseren verbindlichsten Dank aus.

oder z. B. auf den Füllungseffekt zurückzuführen ist, war nicht sicher zu entscheiden. Die Darmschleimhaut der getöteten Tiere zeigte makroskopisch keine Besonderheiten; sie war vielleicht — ähnlich wie nach Glycerin — etwas gerötet ^{vgl. 27}. Abgesehen von einer leichten Hyperämie bei einem Glycerintier waren auch bei der mikroskopischen Untersuchung keine Veränderungen zu erkennen.

Bei intracutaner (0,2 cm³), subcutaner (0,2 cm³ und 0,8 cm³), intramuskulärer (0,2 cm³) und intravenöser (Hund, Katze; 1,0 cm³ 50%iges Diäthylenglykol) bzw. intraperitonealer (Ratte, Maus; 0,2 cm³) *Injektion* zeigte Diäthylenglykol ebenfalls gute örtliche Verträglichkeit. Weder eine 50%ige wäßrige Lösung noch unverdünntes Diäthylenglykol riefen bei Ratten — Kaninchen, Hunde und Mäuse verhielten sich entsprechend — irgendwelche sichtbaren Veränderungen an den Einstichstellen hervor. Bei der histologischen Untersuchung des 4 Std post injectionem an der Stelle der subcutanen oder intramuskulären Injektion entnommenen Gewebes konnten Verschiedenheiten in der Struktur nach Einwirkung von Diäthylenglykol, Glycerin oder physiologischer Kochsalzlösung (0,2 cm³) nicht nachgewiesen werden.

Der *Blutdruck* wurde durch Diäthylenglykol erst nach intravenöser Injektion von 0,5 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung bzw. 1,0 oder 2,0 cm³ reinen Diäthylenglykols bei Kaninchen und Katze (Numalnarkose) vorübergehend gesenkt. Dauer und Ausmaß der Wirkung waren dabei ebenso wie nach Zufuhr von 1,3-Butandiol oder Glycerin abhängig von der verabfolgten Dosis. Ähnlich wie KLEINSORG^{22, 23} es für andere Glykole annimmt, liegt auch der Angriffspunkt von Diäthylenglykol vermutlich in der Peripherie.

Im gleichen Sinne sprechen Versuche am Frosch in der Anordnung von LÄWEN-TRENDELENBURG, die eine deutliche Zunahme der das Gefäßsystem durchfließenden Flüssigkeitsmenge unter der Einwirkung von Diäthylenglykol ergaben. So steigerte 0,1 cm³ einer 20%igen wäßrigen Diäthylenglykol-Lösung, in die RINGER-Lösung zuführende Leitung injiziert, den Durchfluß um etwa 75%.

Auf *glattmuskuläre Organe* (isolierter Dünndarm und Enddarm der Ratte; isolierter Meerschweinchenuterus) wirkt Diäthylenglykol erst in hohen Konzentrationen. Im Vordergrund des Wirkungsbildes steht ein Nachlassen des Tonus und etwa bestehender Tonusschwankungen.

Am *isolierten Dünndarm* der Ratte hörten unter dem Einfluß einer Diäthylenglykol-Konzentration von 1:40 die Tonusschwankungen auf, während die Pendelbewegungen erhalten blieben. Erst eine Konzentration von 1:20 brachte auch die Pendelbewegungen zum Erliegen. Glycerin in gleicher Konzentration führte zu einem Tonusverlust. Am *Enddarm* der Ratte verursachte eine Diäthylenglykolkonzentration 1:20 ebenso wie Glycerin ein Aufhören der Tonusschwankungen. Zu einer

völligen Erschlaffung der Darmstücke (3—4 cm Länge) wie beispielsweise nach 1,3-Butandiol (1:40) kam es nicht. Demzufolge ließ sich eine mit Doryl (1:1520000) hervorgerufene Muskelkontraktion durch Zugabe von Diäthylenglykol nicht, durch Hinzufügen von 1,3-Butandiol gut lösen. Am isolierten Uterus veranlaßte die Zugabe von Diäthylenglykol zur Badflüssigkeit (1:40) ein Aufhören der Tonusschwankungen und eine Tonusabnahme. Glycerin zeigte den gleichen Effekt.

IV. Verhalten des Organismus bei langfristiger, wiederholter Einwirkung von Diäthylenglykol.

Die Frage, ob wiederholte Verabfolgung von Diäthylenglykol die Entwicklung und das Allgemeinverhalten der Versuchstiere beeinflusst, wurde in vier ihrem Wesen nach verschiedenen Versuchen geprüft.

Versuch A wurde an Kaulquappen ausgeführt, deren Gewicht fortlaufend festgestellt wurde. Neben diesem Kriterium kann aber bei Kaulquappen noch die Wandlung der Gestalt, d. h. Zahl und Ausbildung der Extremitäten, als Maß für die Entwicklung herangezogen werden. Verglichen wurde das Wachstum von unter gleichen Bedingungen gehaltenen Kaulquappen, welche in 0,5 oder 1%igen Lösungen von Diäthylenglykol oder Glycerin (Verdünnungsmittel: Teichwasser) gehalten waren. Als Kontrollen dienten Kaulquappen, die in Teichwasser mit entsprechenden Aqua dest.-Zusätzen (0,5 oder 1%) aufwuchsen. Jede Gruppe im gleichen Milieu lebender Kaulquappen umfaßte 40 Tiere.

Versuch B prüfte Wachstum und Allgemeinverhalten von jungen männlichen und weiblichen Ratten*, die werktäglich während eines Zeitraumes von etwa 50 Tagen 1,0 cm³ einer 1, 5, 10 oder 20%igen Lösung von Diäthylenglykol oder vergleichsweise 1,0 cm³ einer 20%igen wäßrigen Glycerinlösung bzw. zur Kontrolle 1,0 cm³ Aqua dest. je 100 g Körpergewicht mit der Schlundsonde erhielten. Insgesamt wurden 120 Ratten (60 ♂, 60 ♀) eingesetzt, deren Durchschnittsgewicht bei Beginn des Versuches etwa 50 g betrug.

Versuch C untersuchte Wachstum und Allgemeinverhalten von jugendlichen männlichen und weiblichen Ratten, die als Trinkwasser ausschließlich eine 1, 2, 5, 10 oder 20%ige wäßrige Lösung von Diäthylenglykol oder von Glycerin angeboten bekamen. 12 Tiere erhielten als Trinkwasser Aqua dest. (Kontrolle). Insgesamt wurden 132 Tiere (66 ♂, 66 ♀) eingesetzt, deren Durchschnittsgewicht zu Beginn des Versuches bei 100 g lag. Bis zum Gewicht von 115 g wurde normales Leitungswasser als Trinkwasser verwendet, anschließend begann der eigentliche Versuch, welcher sich über $\frac{1}{4}$ Jahr erstreckte.

Versuch D sollte klarstellen, ob Diäthylenglykol, zweimal wöchentlich 0,5 cm³ bzw. 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Lösung je 100 g Körpergewicht oral (Schlundsonde) über längere Zeit gegeben, gesundheitliche Schäden hervorruft; auch hier dienten Tiere, denen 1,0 cm³ einer 50%igen wäßrigen Glycerinlösung je 100 g Körpergewicht verabreicht wurde, als Vergleich und mit 1,0 cm³ Aqua dest./100 g behandelte Ratten als Kontrolle. Insgesamt erhielten Diäthylenglykol-Lösung in großer Dosis 90 Tiere (45 ♂, 45 ♀), in kleiner Dosis ebenfalls 90 Tiere von entsprechendem Geschlecht, außerdem bekamen 60 Tiere (30 ♂, 30 ♀) Glycerinlösung

* Kost: Standard-Trockenfutter, gebacken aus Maismehl, Haferflocken, Trockenhefe, Trockenmagermilch, Lebertran und einem Salzgemisch; wenn nicht anders angegeben Wasser ad libitum.

und 60 Tiere Aqua dest. (30 ♂, 30 ♀). Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere betrug bei Versuchsbeginn 120—130 g. In dem Versuch, welcher nahezu $\frac{1}{2}$ Jahr, d. h. etwa ein Viertel der Lebenszeit von Ratten dauerte, wurden insgesamt 300 Ratten eingesetzt.

Allen diesen Versuchen ist gemeinsam, daß sie die Wirkung chronisch zugeführten Diäthylenglykols zum Gegenstand haben; sie unterscheiden sich aber, abgesehen von der Zeitdauer der Versuche und Besonderheiten der Dosis, dadurch, daß z. B. in Versuch A und C das Angebot von Diäthylenglykol stetig gefolgt, während in den Versuchen B und D zwischen den einzelnen Applikationen von Diäthylenglykol mehr oder weniger lange Pausen liegen. Ein Unterschied besteht auch darin, daß in den einzelnen Versuchen die Zufuhr durchaus ihre Eigenheiten hat; im Versuch A ist das Trinkwasser wie das als Lebensraum dienende Wasserglykolhaltig, im Versuch B wird die Prüfsubstanz täglich auf einmal verabfolgt (im übrigen erhalten die Tiere neben dem Standardfutter Leitungswasser ad libitum), im Versuch C können die Ratten keine Flüssigkeit aufnehmen, ohne gleichzeitig Diäthylenglykol zu trinken, schließlich haben die Versuchstiere im Versuch D sich nur zweimal in der Woche, allerdings während eines sehr langen Zeitraumes, mit beträchtlichen Mengen Diäthylenglykol auseinanderzusetzen.

1. Wirkung auf Allgemeinverhalten und Körpergewicht.

Versuch A. Während einer Beobachtungszeit von 23 Tagen nahmen die Diäthylenglykoltiere in gleichem Maße wie die Kontrolltiere (Teich-

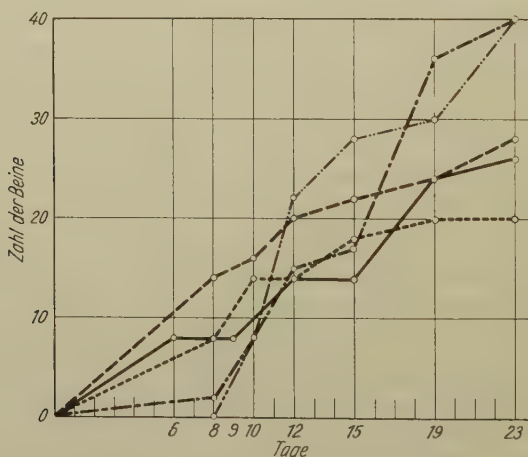


Abb. 1. Entwicklung der Extremitäten von Kaulquappen („Beinkurve“ von je 20 Tieren) bei Aufzucht in Glykol-Wassergemischen. Abszisse: Einwirkungsdauer in Tagen; Ordinate: Zahl der Beine, die während der Versuchszeit zur Entwicklung kamen. — Kontrollen; --- Diäthylenglykol 1000 mg%; Diäthylenglykol 500 mg%; -.-.- Glycerin 1000 mg%; -.-.-.- Glycerin 500 mg%.

wasser mit Aqua dest.-Zusatz) zu. Am 23. Tag betrug das Durchschnittsgewicht von ersteren 254 mg (bei 0,5%iger Diäthylenglykollösung 260 mg, bei 1%iger 248 mg), das der Kontrollen 239 mg. Entsprechend verlief auch die Entwicklung der Extremitäten übereinstimmend (Abb. 1). In demselben Zeitraum zeigten die Glycerintiere eine stärkere Gewichts-

zunahme (Durchschnittsgewicht am 23. Versuchstag bei 0,5%iger Lösung 411 mg, bei 1%iger Lösung 313 mg) und gleichlaufend eine Beschleunigung der Metamorphose⁷.

Versuch B. Bis zum Abschluß der Versuchszeit wiesen die Tiere keinerlei Zeichen einer Schädigung auf und verhielten sich ebenso wie Ratten der Kontrollgruppe. Auch der Gewichtszuwachs in der Zeit der Diäthylenglykolfuhr war völlig normal; er betrug nach 50tägiger Versuchsdauer (1,0 cm³/100 g wäßrige Diäthylenglykollösung) in Gruppe 1 (1% ig) durchschnittlich 56 g je Tier, in Gruppe 2 (5% ig) 52 g, in Gruppe 3 (10% ig) 52 g, in Gruppe 4 (20% ig) 50 g, in Versuchsgruppe 5 (1,0 cm³/100 g 20% ige wäßrige Glycerinlösung) 47 g, in Kontrollgruppe 6 (1,0 cm³/100 g Aqua dest.) durchschnittlich 45 g je Tier. Bei den Diäthylenglykol-Tieren war also vielleicht eine etwas bessere, sicher aber keine schlechtere Gewichtszunahme als bei Vergleichs- und Kontrolltieren zu beobachten, obschon die oral verabfolgte Menge Diäthylenglykol, berechnet auf unverdünnte Substanz, etwa einem Fünftel, dem Einfachen, Doppelten oder Vierfachen der an der Ratte ermittelten akuten LD 50 (per os) entsprach. Ein Unterschied in der Letalität bestand zwischen Versuchs-, Vergleichs- und Kontrolltieren *nicht*; die wenigen Todesfälle konnten eindeutig auf interkurrente Erkrankungen oder technische Fehler (Fehlsondierungen) zurückgeführt werden.

Versuch C. Bei einem Vergleich der Tiergruppen, denen 1 oder 2% ige wäßrige Lösungen von Diäthylenglykol bzw. Glycerin als „Trinkwasser“ angeboten wurden, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede. Die Gewichtszunahme der Versuchs- und Vergleichstiere war innerhalb $\frac{1}{4}$ Jahres ebenso wie bei den Kontrollen (Abb. 2). Lediglich von den Ratten, welche 2% ige Diäthylenglykollösung erhielten, ging ein Tier in der 11. Versuchswoche zugrunde, nachdem es bis zu diesem Zeitpunkt normal zugenommen hatte. In höheren Konzentrationen (5, 10, 20%) führte Diäthylenglykol innerhalb reichlich einer Woche zu stetigem Gewichtsverlust und schließlich zum Tode der Versuchstiere, während Glycerin als 1, 2, 5 oder 10% ige wäßrige Lösung Lebensdauer und Körpergewicht nicht beeinträchtigte. Nur von den 12 unter der Einwirkung einer 20% igen Glycerinlösung stehenden Ratten gingen 2 Tiere in der 6. Versuchswoche ein, die übrigen zeigten zu diesem Zeitpunkt zwar gewisse Störungen der Entwicklung und Gewichtszunahme, erholten sich aber und nahmen im weiteren Verlauf des Versuches normal zu, so daß gegen Ende der Versuchszeit bei ihnen keine Zeichen eines gesundheitlichen Schadens zu erkennen waren.

Versuch D. Entsprechend den im Versuch B gemachten Beobachtungen wurden weder bei männlichen (Abb. 3) noch bei weiblichen Tieren der Diäthylenglykolgruppen eine Beeinträchtigung von Körpergewicht und Allgemeinbefinden gesehen. Alle Ratten entwickelten

sich normal und unterschieden sich nicht von den Tieren der Vergleichs- und der Kontrollgruppe, auch die Sterblichkeit war in sämtlichen Gruppen gleich. Nach 6, 12 und 18 Wochen wurden 8–20 Ratten jeder

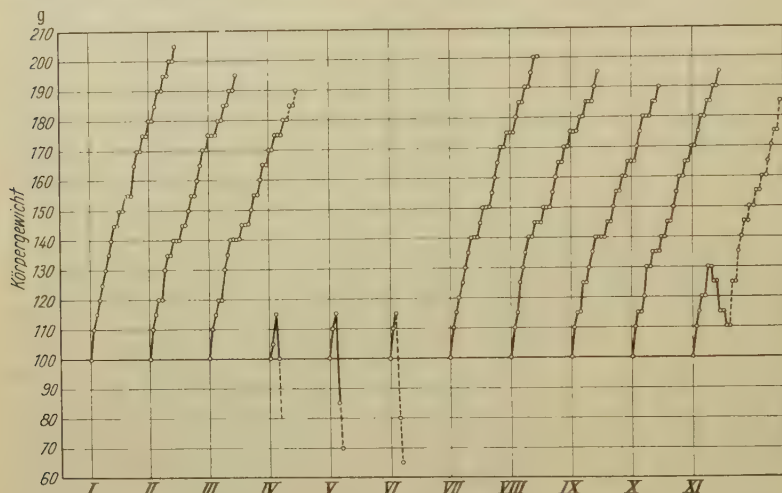


Abb. 2. Einfluß von Diäthylenglykol im Trinkwasser auf das Körpergewicht von Ratten (Vergleichssubstanz: Glycerin; Verdünnungsmittel: Aqua dest.; Kontrolle: Aqua dest.; Versuchszeit: 96 Tage). Wägung: zweimal wöchentlich im Abstand von 3–4 Tagen. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem mittleren Körpergewicht von 12 Ratten (6 ♂ und 6 ♀). Punktierung der Kurve deutet an, daß die Tiergruppe nicht mehr vollzählig ist. — I Kontrolle (Aqua dest.); II wäßrige Diäthylenglykollösung (1%); III wäßrige Diäthylenglykollösung (2%); IV wäßrige Diäthylenglykollösung (5%); V wäßrige Diäthylenglykollösung (10%); VI wäßrige Diäthylenglykollösung (20%); VII wäßrige Glycerinlösung (1%); VIII wäßrige Glycerinlösung (2%); IX wäßrige Glycerinlösung (5%); X wäßrige Glycerinlösung (10%); XI wäßrige Glycerinlösung (20%). — Beginn der Zufuhr von Prüfsubstanzen nach Erreichen eines mittleren Körpergewichtes von 115 g.

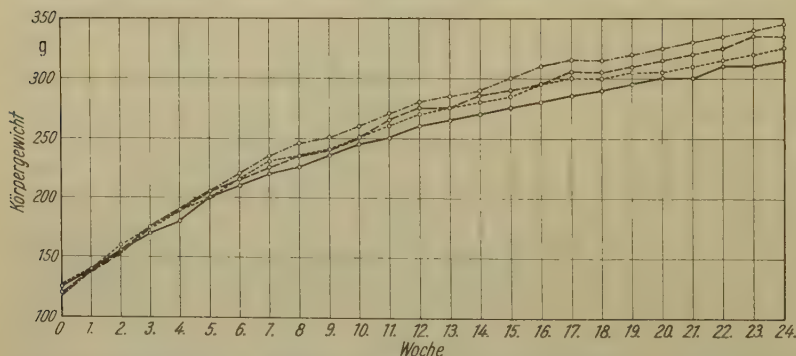


Abb. 3. Wachstumskurve von männlichen Ratten bei zweimal wöchentlicher Einwirkung einer 50%igen wäßrigen Diäthylenglykollösung (1,0 cm³ je 100 g Körpergewicht per os, Schlundsonde —; 0,5 cm³ je 100 g Körpergewicht per os, Schlundsonde), einer 50%igen wäßrigen Glycerinlösung (1,0 cm³ je 100 g Körpergewicht per os, Schlundsonde ----) bzw. Aqua dest. (1,0 cm³ je 100 g Körpergewicht per os, Schlundsonde -.-.-). Abszisse: Behandlungszeit in Wochen. Ordinate: Körpergewicht in Gramm. Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert von 2 Wägungen und stellt den Durchschnittswert von 18, 20, 15, 15 Tieren dar.

Tiergruppe getötet, anschließend seziiert und ihre Organe zur feingeweblichen Untersuchung entnommen.

2. Pathologische Anatomie.

Bei der Sektion wiesen die Diäthylenglykoltiere des *Versuches B* keinerlei Besonderheiten gegenüber den Glycerin- und den Kontrolltieren auf. Auch histologisch waren Herz, Leber, Niere, Magen, Darm, Blase, Milz, endokrine Drüsen nicht verändert. Die Leber (BEST-Färbung) zeigte bei allen Tieren einen normalen Gehalt an Glykogen.

In *Versuch C* wurden von den eingesetzten 12 Tieren der Versuchsgruppe Diäthylenglykol 5, 10 und 20% ig nach dem Tode von 10 Tieren die letzten 2 Ratten getötet und seziiert; dabei war die Kleinheit der Milz auffallend, die sehr schmal und glanzlos dem Magen anlag. Sonst fehlten verwertbare krankhafte Veränderungen. Im mikroskopischen Bild waren bei diesen Tieren die Leberzellen verkleinert und verdichtet (wie bei Hunger), in den Nieren die Epithelien der Hauptstücke teilweise stark gequollen und vacuolisiert, stellenweise mit Übergang in Nekrose, die Herzmuskelfasern schmal, ihre Kerne klein und dicht (wie bei Hunger), die Milz atrophisiert (wie bei Hunger), die Nebennieren im allgemeinen unverändert, in einem Fall war der Lipoidgehalt wie bei Hunger gering, Darm, Lunge sowie endokrine Organe waren normal. Die übrigen Diäthylenglykoltiere boten ebenso wie die Glycerin- und die Kontrollratten weder bei der Sektion noch bei der histologischen Untersuchung der inneren Organe Besonderheiten.

Bei der Sektion der nach 6, 12 und 18wöchiger Dauer des *Versuches D* getöteten Ratten fehlten ebenso wie bei der Sektion der übrigen Tiere bei Abschluß des Versuches (nach 24 Wochen) krankhafte Veränderungen. Auch die Feinstruktur von Niere, Blase, Leber, Milz und endokrinen Organen war stets normal. Die Leber (BEST-Färbung) zeigte sich bei den Tieren aller Gruppen in gleicher Weise mit Glykogen gefüllt.

Unabhängig von der Art der Behandlung wurde bei einigen Ratten Wurmbefall nachgewiesen; entsprechend waren hier parasitär bedingte Veränderungen z. B. des Darmes zu finden.

Die bei der histologischen Untersuchung (akute Vergiftung; Versuch C) gewonnenen Befunde entsprechen also weitgehend den bereits früher mitgeteilten Beobachtungen^{16, 21, vgl. 33, 38}. Die von HANZLIK¹³ und WEATHERBY³⁶ getroffene Feststellung, daß nur infolge der Diäthylenglykolvergiftung eingegangene Tiere im mikroskopischen Bild erkennbare Veränderungen aufweisen, kann bestätigt und dahingehend erweitert werden, daß auch sterbende Tiere — jedenfalls unter den Bedingungen des Trinkversuches — derartige Schäden erkennen lassen.

3. Beeinflussung der endokrinen Organe.

Zur Beurteilung der Tätigkeit einiger innersekretorischer Organe wurde bei 12 weiblichen Ratten, die entsprechend dem Versuch B werktätig je 100 g Körpergewicht 1,0 cm³ einer 20% igen wäßrigen Lösung

von Diäthylenglykol bzw. von Glycerin erhielten, täglich der Scheidenabstrich (ALLEN-DOISY-Test) untersucht. Störungen des Zyklus fehlten bei den Diäthylenglykoltieren weitgehend, geringe Unregelmäßigkeiten gingen über das Maß der auch bei Glycerintieren während der 50-tägigen Versuchszeit beobachteten Veränderungen nicht hinaus.

Außerdem wurden je 10 dieser Ratten anschließend zu einem Fortpflanzungsversuch herangezogen, in welchem die Weibchen mit männlichen Tieren, denen in gleicher Weise Diäthylenglykol bzw. Glycerin per os verabfolgt worden war, gepaart wurden (während 10 Tagen, täglicher Wechsel der Partner). Zur Kontrolle dienten Ratten aus der gleichen Zucht, welche an Stelle der Prüfsubstanzen Aqua dest. bekamen. Praktisch ergaben sich keine Unterschiede zwischen Versuchs-, Vergleichs- und Kontrolltieren; es wurden jeweils etwa gleich viel Ratten trächtig, die Würfe waren von annähernd gleicher Größe. Lebensfähigkeit, Entwicklung und Fruchtbarkeit der Jungtiere zeigten keine Besonderheiten (ausführliche Darstellung siehe³⁷).

Bei allen am Ende der Versuche B, C und D getöteten Tieren waren die Gewichte der entnommenen endokrinen Organe (Hypophyse, Schilddrüse, Nebenniere und Ovarien) normal.

4. Wirkung auf den Stoffwechsel.

Als Maß für den Stoffwechsel der Versuchstiere (Ratten) diente ihr Sauerstoffverbrauch, der nach einer im hiesigen Institut üblichen mehr-

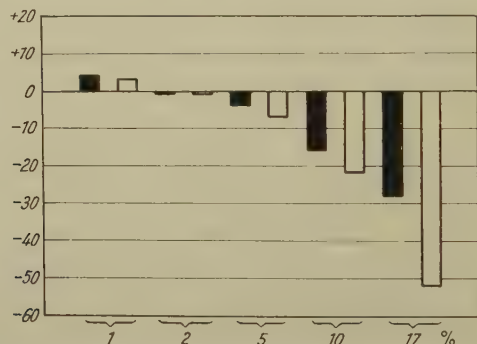


Abb. 4. Sauerstoffverbrauchswerte von Bäckerhefe bei Zusatz von Diäthylenglykol bzw. Glycerin. Null-Linie: Sauerstoffverbrauch von Hefezellen bei Zusatz von Aqua dest. (Kontrollen). Säulen oberhalb bzw. unterhalb der Null-Linie geben die Förderung bzw. Hemmung des O_2 -Verbrauches in Prozent gegenüber den Kontrollen an. Ausgefüllte Säulen: Diäthylenglykol, umrandete Säulen: Glycerin. Die mit Klammern versehenen Prozentzahlen stellen den Gehalt an Prüfsubstanz im Ansatz dar. Ansatz: 1,5 cm³ Hefesuspension 1%; 0,5 cm³ Diäthylenglykol- bzw. Glycerinlösung (Endkonzentration im Reaktionsraum: 1, 2, 5, 10, 17%) bzw. Aqua dest. (Kontrollen); 0,5 cm³ Glucoselösung 5%; 0,2 cm³ 2 n KOH im Einsatz. Temperatur: 25° C; im Reaktionsraum atmosphärische Luft.

wöchigen Vorperiode am 4., 6., 8., 11., 13., 18., 20. und 22. Tage des Versuches während 1 Std gemessen wurde. Verglichen wurden die

Sauerstoffverbrauchswerte von 12 bzw. 11 Ratten (♂ und ♀, 160—220 g), welche 21 Tage täglich 1,0 cm³ einer 20%igen wäßrigen Lösung von Diäthylenglykol bzw. 1,0 cm³ Wasser (Kontrolltiere) je 100 g Körpergewicht erhielten. Der Sauerstoffverbrauch von Ratten wird durch Diäthylenglykol praktisch nicht beeinflußt. Dieses Ergebnis entspricht dem in früheren Versuchen mit Glycerin erhaltenen Resultat.

Eine ähnliche Übereinstimmung zwischen der Wirkung von Diäthylenglykol und Glycerin zeigte sich auch bei Prüfung ihres Einflusses auf den Sauerstoffverbrauch von Hefezellen, die häufig bei Untersuchungen des Zellstoffwechsels als Modell herangezogen werden. Gleiche Konzentrationen von Diäthylenglykol und Glycerin hemmten den Sauerstoffverbrauch von Hefesuspensionen in etwa gleichem Maße (Abb. 4).

5. Wirkung auf das Blutbild.

In analoger Weise wie die Tiere des Versuches B wurden zusätzlich 9 bzw. 11 männliche erwachsene Ratten werktäglich mit 1,0 cm³ einer 20%igen wäßrigen Lösung von Diäthylenglykol bzw. Glycerin je 100 g Tier behandelt. Vor Beginn und am Ende des Versuches wurde von jedem Tier ein Blutbild angefertigt (Erythrocytenzahl, Leukocytenzahl, Hämoglobingehalt, Differentialausstrich). Eine wesentliche Änderung der Blutbefunde fehlte, zwischen Diäthylenglykol und Glycerintieren bestand kein Unterschied.

Weiterhin wurden nach Art des Versuches D behandelten Ratten (♂, Durchschnittsgewicht 200 g; 7 Diäthylenglykol-, 10 Glycerintiere) vor Beginn des Versuches sowie nach 6, 12, 18 und 24wöchiger Versuchsdauer Blutproben entnommen. Auch in diesem langfristigen Versuch traten keine Anzeichen für eine Schädigung des Blutes oder der blutbildenden Organe auf.

6. Wirkung auf Knochensystem und Gebiß.

Röntgenuntersuchungen des Gebisses, des Ober- und Unterschenkels von Tieren des Versuches B, welche am 49. Versuchstag bei je 4 Tieren jeder Gruppe durchgeführt wurden, ergaben keinen Anhalt für Schäden der Zähne und ihres Halteapparates sowie des Knochensystems allgemein. Desgleichen blieben entsprechende Röntgenuntersuchungen von Tieren des Versuches D, welche zu Beginn sowie in Abständen von 6 Wochen bei je 6 Tieren jeder Gruppe durchgeführt wurden, ohne abnormen Befund.

V. Wirkung nach äußerlicher Anwendung.

Es wurde bereits erwähnt, daß bei Einwirkung von Diäthylenglykol auf Haut oder Schleimhaut keine entzündliche Reizung, Verätzung oder Verschorfung nachzuweisen ist. Darüber hinaus sind auch keine Anzeichen für resorptive Schäden zu finden.

Für die *Haut* ergaben sich diese Feststellungen einmal aus Versuchen an Ratten, deren Schwänze an 4 bzw. 6 Tagen für je 4 bzw. 1 oder 2 Std in unverdünntes Diäthylenglykol eingetaucht waren, zum anderen aus den ebenfalls schon erwähnten Versuchen an Meerschweinchen. Genau so indifferent verhielt sich das vergleichsweise geprüfte Glycerin. Bei der Sektion der Tiere fehlten ebenso wie bei der feingeweblichen Untersuchung der Haut und der inneren Organe (Milz, Leber, Niere) pathologische Veränderungen.

Auch bei Prüfung der Diäthylenglykol-Wirkung von der *Schleimhaut* des Enddarmes aus traten keine resorptiven Veränderungen auf; so zeigten Ratten, die an 14 Tagen einmal täglich 0,5 cm³ einer 5%igen wäßrigen Diäthylenglykollösung während der 16tägigen Versuchsdauer rectal erhielten, keine Abweichungen des Allgemeinverhaltens, narkotische Erscheinungen oder ähnliches. Zum gleichen negativen Ergebnis führten Versuche, in denen Ratten Seifenlösungen (in 1000 cm³ Leitungswasser 3 g Seife gelöst, die zu 5% Diäthylenglykol bzw. Glycerin enthielt oder Zusatzfrei war) bzw. Zäpfchen aus den verschiedenen Seifensorten in entsprechender Weise verabfolgt wurden. Auch bei der Sektion der 50 in diesen Versuchen verwendeten Ratten sowie bei der histologischen Untersuchung von Leber und Niere waren keine Veränderungen zu erkennen. Als unmittelbare Folge der Einläufe bzw. des Einführens der Zäpfchen trat im allgemeinen eine Abführwirkung ein.

VI. Wirkung in Kombination mit anderen Wirkstoffen.

Ebenso wie für andere mehrwertige Alkohole gilt auch für den Äther-Alkohol Diäthylenglykol, daß bei seiner Verabfolgung zusammen mit einem Wirkstoff die Wirkung des Kombines abgewandelt sein kann gegenüber dem Effekt einer wäßrigen Wirkstofflösung. Es soll hier nicht darauf eingegangen werden, wie solche Kombinationswirkungen zustande kommen könnten, sondern nur an einigen Beispielen gezeigt werden, inwieweit in Kombinationen Diäthylenglykol ähnlich wirkt wie Glycerin oder andere mehrwertige Alkohole und inwieweit es sich von ihnen unterscheidet.

Ein *resorptionsverzögernder Effekt* von Diäthylenglykol dürfte der Grund dafür sein, daß der Gehalt des Blutes an Methylthiouracil wesentlich langsamer zunahm, wenn 4-Methyl-2-thiouracil — eine Verbindung, die in früheren Versuchen dieser Art¹⁷ schon als Testsubstanz gewählt wurde — statt in physiologischer Kochsalzlösung in Diäthylenglykol gelöst subcutan injiziert war. Die Verzögerung des Anstieges der Methylthiouracil-Konzentration im Blut betrug nach 30 min 65,4%, nach 60 min 50,0%, nach 90 min 27,5% und war 120 min nach der Injektion nicht mehr festzustellen.

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 100 weißen Ratten (♂ und ♀, 160—220 g) durchgeführt. Je 50 Tiere erhielten einmal 0,1 g 4-Methyl-2-thiouracil gelöst in 4,0 cm³ physiologischer Kochsalzlösung bzw. gelöst in 4,0 cm³ unverdünntem Diäthylenglykol subcutan unter die Rückenhaut injiziert. 30, 60, 90, 120 und 180 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet, das entnommene Blut zentrifugiert und im Plasma der Gehalt an 4-Methyl-2-thiouracil bestimmt.

Ähnlich zu deuten sind die Ergebnisse, welche mit Cardiazol, das in physiologischer Kochsalzlösung, in unverdünntem Diäthylenglykol bzw. in 25%igem wäßrigen Diäthylenglykol gelöst war, gewonnen wurden. Bei Verabfolgung von Cardiazol (0,09 g je Kilogramm Körpergewicht subcutan) in physiologischer Kochsalzlösung gingen von 30 so behandelten Mäusen 20, nach Injektion von Cardiazol in unverdünntem Diäthylenglykol nur 6 von 30 Tieren, bei Applikation von Cardiazol in 25%iger wäßriger Diäthylenglykollösung 13 von 30 Mäusen zugrunde. Daß dieser Unterschied in der Wirkung auf eine durch die visköse Substanz bedingte Resorptionsverzögerung zurückzuführen ist, dafür spricht folgende Beobachtung: nach gleichzeitiger, aber örtlich getrennter Injektion von wäßriger Cardiazollösung und unverdünntem Diäthylenglykol traten bei 27, nach wäßriger Cardiazollösung und 25%igem wäßrigen Diäthylenglykol bei 26 der 30 jeweils gleich behandelten Mäuse Krämpfe und Tod ein. Diäthylenglykol wirkt also wohl nicht antikonvulsiv.

Gemeinsam mit anderen mehrwertigen Alkoholen hat Diäthylenglykol auch den unter bestimmten Bedingungen nachweisbaren *permeationsbegünstigenden Effekt*.

So konnte in Versuchen, welche den Einfluß von Diäthylenglykol und von Glycerin (0,25 cm³/10 g Maus intramuskulär) auf den Übertritt von intravenös gegebener Sulfanilsäure bzw. intravenös zugeführtem Eleudron (0,1 cm³ einer 2%igen Lösung je 10 g Körpergewicht) in das Gehirn von Mäusen prüften¹, gezeigt werden, daß der Sulfonamidgehalt der Gehirne derartig behandelter Tiere gegenüber den Kontrolltieren, denen an Stelle der mehrwertigen Alkohole physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde, beträchtlich erhöht war.

VII. Beobachtungen beim Menschen.

Um einen Anhalt für die Übertragbarkeit der Ergebnisse des Tierversuches auf die Verhältnisse beim Menschen zu gewinnen, wurde an hautgesunden freiwilligen Versuchspersonen orientierend das Verhalten der Haut nach Einwirkung von unverdünntem Diäthylenglykol geprüft. Zweimal täglich, für jeweils 2 Std mit einem Wattebausch auf die Haut des Unterarmes gebracht, rief Diäthylenglykol keine örtlichen Reizwirkungen hervor, das Wohlbefinden der 12 Versuchspersonen (7 ♂, 5 ♀) blieb ungestört; zur Kontrolle durchgeführte Harnproben fielen stets normal aus und zeigten das grundsätzlich gleiche Ergebnis wie vor Beginn des Hauttestes. Desgleichen waren auch nach Verwendung von Diäthylenglykol enthaltenden Zubereitungen keine Schäden am Ort

der Einwirkung festzustellen. Die Haut blieb nach täglichen Vollbädern (Versuchszeit: 15 Tage), bei denen eine Seife mit 5% igem Diäthylenglykol-Zusatz benutzt wurde, frei von Reizerscheinungen, ein Befund, an dem auch zusätzliche UV.-Bestrahlung der Haut nichts änderte.

An der Schleimhaut des Schlundes fehlten Reizerscheinungen, wenn eine 50% ige wäßrige Diäthylenglykollösung (4 Tage, täglich 1—2 cm³) getrunken wurde. Abgesehen von einem geringen, rasch vorübergehenden Wärmegefühl traten keinerlei bemerkenswerte Sensationen auf, das Allgemeinbefinden war nicht beeinträchtigt, mehrfache Harnuntersuchungen ließen keine krankhaften Veränderungen erkennen. Ebenso wenig schädigte die Einwirkung einer Diäthylenglykol-haltigen Zahnpasta (Menthol 1,0, Sapo medicat. 10,0, Calc. carbon. 35,0, Magn. carbon. 10,0, Saccharin 0,05, Ol. menth. pip. gtt. XXX, Ol. Caryoph. gtt. V, Diäthylenglykol ad 115,0) die Mundschleimhaut und das Allgemeinbefinden, wie aus einem orientierenden Versuch (1½ Monate täglich zweimaliges Reinigen der Zähne, Verbrauch an Zahnpasta etwa 62 g) hervorging.

Wenn die beschriebenen Untersuchungen auch keineswegs ausreichen, um für die menschliche Haut eine Verträglichkeit von Diäthylenglykol einschränkungslos zu beweisen, so lassen sie in Verbindung mit den Angaben von SCHNEIDER³⁴ sowie den erwähnten Tierversuchen doch die Feststellung zu, daß Diäthylenglykol sicher keine Veränderung der Haut, etwa in Form einer Blasenbildung, Entzündung, Verschorfung oder ähnliches hervorruft, und daß bei sinnvoller Verwendung eine Gefährdung offenbar nicht gegeben ist.

VIII. Besprechung der Versuchsergebnisse.

Aus allen mitgeteilten Befunden, sowohl im akuten als auch im chronischen Versuch gewonnenen, ergibt sich, daß die Wirkungen von Diäthylenglykol und Glycerin weitgehend übereinstimmen. Es kann darauf verzichtet werden, die erhaltenen Ergebnisse nochmals im einzelnen anzuführen und auf ihre Bedeutung für die toxikologische Beurteilung beider Verbindungen hinzuweisen. Dagegen muß auf die von der Glycerinwirkung abweichenden Diäthylenglykol-Effekte sowie auf gewisse Widersprüche zu literaturmäßig vorliegenden Angaben eingegangen werden.

Als erstes wäre hier die über 24 Std andauernde Giftwirkung sehr großer Mengen von Diäthylenglykol zu nennen; der gegenüber Glycerin langsamere Ablauf der Diäthylenglykol-Vergiftung läßt in erster Linie an eine verzögerte Elimination denken, wobei unter Elimination sowohl die Ausscheidung als auch eine Umwandlung zu indifferenten oder jedenfalls anders wirksamen Verbindungen verstanden werden soll. Obwohl diese Tatsache zweifellos von Interesse ist, braucht ihr im allgemeinen

wohl kaum eine praktische Bedeutung beigemessen zu werden, denn auch bei zeitloser Bestimmung ist die mittlere tödliche Dosis von Diäthylenglykol immer noch niedrig und in chronischen Fütterungsversuchen wurden keine Anzeichen für eine Kumulation gefunden.

Ein ebenfalls unter normalen Bedingungen wohl weitgehend bedeutungsloser Befund ist der Unterschied in der diuretischen Wirkung von Diäthylenglykol und Glycerin. Die Diurese nach Verabfolgung von Diäthylenglykol ist beträchtlich stärker als nach Glycerin, eine Erscheinung, für die ursächlich vielleicht das dem Diäthylenglykol eigene, etwas stärkere Wasseranziehungsvermögen verantwortlich ist, vielleicht sind aber auch hier Unterschiede in der Elimination beider Substanzen von Einfluß.

Auffallend ist die sehr rasche Entwicklung von Kaulquappen, welche in verdünnter Glycerinlösung gehalten werden. Die Tiere nehmen schneller an Körpergewicht zu und wachsen besser als in Teichwasser oder in verdünnter Diäthylenglykollösung lebende Kaulquappen. Der Grund für dieses beschleunigte Wachstum liegt vielleicht darin, daß Glycerin als Nährstoff ausgenutzt werden kann, Diäthylenglykol aber nicht. Vom Glycerin ist beispielsweise bekannt⁴, daß es — im Gegensatz zu Diäthylenglykol^{14, 31} — unter bestimmten Bedingungen als Glykogenbildner dienen kann. Im gleichen Sinne könnte übrigens auch die Beobachtung gedeutet werden, daß wäßrige Glycerinlösungen niedriger Konzentration leicht trübe werden, also „faulen“, d. h. Mikroorganismen Lebensmöglichkeit bieten, während entsprechende Diäthylenglykollösungen klar bleiben.

Für die Einordnung der an Kaulquappen gewonnenen Befunde muß berücksichtigt werden, daß hier nicht von einem schlechten Wachstum der Diäthylenglykol-Tiere gesprochen werden kann — sie verhalten sich nämlich ebenso wie die Kontrollen —, vielmehr ist die Entwicklung der in Glycerinlösung aufwachsenden Kaulquappen als übernormal anzusehen und zu werten.

Als letztes verdient die Feststellung Beachtung, daß Ratten, denen als einzige Flüssigkeit 5, 10 oder 20% ige wäßrige Diäthylenglykollösung angeboten wird, im Gegensatz zu Tieren, die 1 bzw. 2% ige Lösungen oder 1—20% ige Glycerinzubereitungen erhalten, nach erheblichen Gewichtsverlusten zugrunde gehen vgl. ^{9, 18, 36}. Diese Tatsache ist schwierig zu erklären, zumal größere Mengen von Diäthylenglykol, als höher konzentrierte Lösung über lange Zeit täglich einmal mit der Schlundsonde verabreicht, ohne sinnfällige Erscheinungen vertragen werden. Zweifellos ist auch hier an Unterschiede in der Elimination zu denken; es scheint aber keineswegs sicher, daß nicht weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Bei dem Versuch, die angeführten Ergebnisse unter einem einheitlichen Gesichtspunkt zu betrachten, liegt es nahe, für die Abweichungen der Diäthylenglykol- von der Glycerinwirkung Besonderheiten in der

Elimination verantwortlich zu machen. Es spricht manches dafür, daß Glycerin sowohl unverändert durch die Niere ausgeschieden wird als auch in den normalen Stoffwechsel eingehen kann, während Diäthylenglykol auf nur einem Wege, nämlich mit dem Harn eliminiert werden dürfte. Eine solche Erklärung bietet sich nach den bisher erarbeiteten Befunden zwar an, kann aber noch nicht als bewiesen gelten.

Wegen der bestehenden Divergenz zwischen den Befunden von HANZLIK¹⁵ sowie DOERR einerseits und FORST⁶ andererseits muß auf die mitgeteilten Versuche, welche sich mit der Wirkung von Diäthylenglykol und Glycerin nach Aufbringen auf die Haut beschäftigen, besonders aufmerksam gemacht werden. Obwohl die Ergebnisse mit anderer Methode gewonnen sind, sprechen auch sie im Sinne der von FORST vertretenen Ansicht, daß Diäthylenglykol ebenso wenig wie Äthylenglykol oder Glycerin von der Haut aus Giftwirkungen entfaltet.

Die orientierenden Prüfungen am Menschen erbrachten ebenfalls keinen Anhalt für örtliche oder resorptive Schäden durch Diäthylenglykol.

Weiterhin sei noch darauf hingewiesen, daß die von HOLCK¹⁸ bei Rattenweibchen, welche verdünntes Diäthylenglykol als Trinkwasser erhalten hatten, beobachtete Beeinträchtigung der Fertilität in den mitgeteilten Versuchen, d. h. bei Ratten, denen 20%ige wäßrige Diäthylenglykollösung einmal täglich mit der Schlundsonde verabfolgt wurde, trotz der weitaus größeren Dosis nicht eintrat.

Vielleicht hat auch hier die Art der Verabreichung — einmal hohe Einzeldosen, das andere Mal protrahierte Zufuhr ohne die Möglichkeit des Verdünnens — entscheidenden Einfluß.

Schließlich muß an bereits früher ausgeführte Versuche erinnert werden, aus denen hervorgeht, daß Diäthylenglykol, in Kombination mit Wirkstoffen gegeben, den Effekt des Kombinatens zu beeinflussen vermag. Dieser Umstand ist bei Verwendung von Diäthylenglykol — ebenso wie auch bei Verwendung anderer Lösungsmittel — zu berücksichtigen.

IX. Zusammenfassung.

Bei vergleichender Untersuchung zeigt Diäthylenglykol ähnliche Effekte wie Glycerin. Diese weitgehende Übereinstimmung kommt sowohl in akuten als auch in chronischen Versuchen zum Ausdruck und gilt für örtliche wie resorptive Wirkungen. Abweichungen, welche beobachtet wurden, dürfen vielleicht auf Unterschiede in der Elimination der beiden geprüften Verbindungen bezogen werden; toxikologisch müssen sie in entsprechenden Fällen, d. h. also bei speziellen Verwendungszwecken, bedacht werden, ohne generell eine Contraindikation für die Anwendung von Diäthylenglykol darzustellen.

Literatur.

- ¹ BORNMAN, G., G. HESS u. R. KOPF: *Arzneimittel-Forsch.* **3**, 29 (1953). —
² BORNMAN, G., u. K. RITTER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **219**, 57 (1953). —
³ BURN, J. H.: *Biologische Auswertungsmethoden*, S. 29. Berlin: Springer 1937. —

⁴ CATRON, L. F., and H. B. LEWIS: J. of Biol. Chem. **84**, 553 (1929). — ⁵ ENDERS, A., u. A. MOENCH: Arzneimittel-Forsch. **2**, 587 (1952). — ⁶ FORST, A. W.: Tag. Dtsch. Pharmakolog. Ges., Göttingen 1952 u. persönl. Mitteilung. — ⁷ GROSSKINSKY, L., u. E. STÜRMER: Z. exper. Med. **120**, 134 (1953). — ⁸ HAAG, H. B.: J. Lab. and Clin. Med. **22**, 341 (1937). — ⁹ HAAG, H. B., and A. M. AMBROSE: J. of Pharmacol. **59**, 93 (1937). — ¹⁰ HANZLIK, P. J., W. S. LAWRENCE and G. L. LAQUEUR: J. Industr. Hyg. Toxicol. **29**, 233 (1947). — ¹¹ HANZLIK, P. J., F. P. LUDUENA, W. S. LAWRENCE and H. HANZLIK: J. Industr. Hyg. Toxicol. **29**, 190 (1947). — ¹² HANZLIK, P. J., H. G. MERTENS and J. B. SPAULDING: J. of Pharmacol. **49**, 300 (1933). — ¹³ HANZLIK, P. J., H. W. NEWMAN, W. VAN WINKLE jr., A. J. LEHMAN and N. K. KENNEDY: J. of Pharmacol. **67**, 101 (1939). — ¹⁴ HANZLIK, P. J., A. J. LEHMAN, W. VAN WINKLE jr. and N. K. KENNEDY: J. of Pharmacol. **67**, 114 (1939). — ¹⁵ HANZLIK, P. J., W. S. LAWRENCE, J. K. FELLOWS, F. P. LUDUENA and G. L. LAQUEUR: J. Industr. Hyg. Toxicol. **29**, 325 (1947). — ¹⁶ HARRIS, P. N.: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 164 (1949). — ¹⁷ HESS, G., u. R. KOPF: Arzneimittel-Forsch. **3**, 72 (1953). — ¹⁸ HOLCK, H. G. O.: J. Amer. Med. Assoc. **109**, 1517 (1937). — ¹⁹ KÄRBER, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 509 (1951). — ²⁰ KAREL, L., B. H. LANDING and TH. S. HARVEY: J. of Pharmacol. **90**, 338 (1947). — ²¹ KESTEN, H. D., M. G. MULINOS and L. POMERANTZ: Arch. of Path. **25**, 759 (1938). — ²² KLEINSORG, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 103 (1953). — ²³ KLEINSORG, H., u. H. HOCHGREBE: Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 152 (1953). — ²⁴ KOPF, R., A. LOESER u. G. MEYER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 346 (1950). — ²⁵ KÜCHLE, H. J., A. LOESER, G. MEYER u. E. STÜRMER: Z. exper. Med. **119**, 266 (1952). — ²⁶ LAUG, E. P., H. O. CALVERY, H. J. MORRIS and G. WOODARD: J. Industr. Hyg. Toxicol. **21**, 173 (1939). — ²⁷ LAUNOY, L.: J. Pharmacie IX s. **2**, 99 (1942), ref. Ber. Physiol. **132**, 479 (1943). — ²⁸ LEPKOWSKY, S., R. A. OUER and H. M. EVANS: J. of Biol. Chem. **108**, 431 (1935). — ²⁹ MEYER, G., u. E. STÜRMER: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 193 (1952). — ³⁰ MORRIS, H. J., A. A. NELSON and H. O. CALVERY: J. of Pharmacol. **74**, 266 (1942). — ³¹ NEWMAN, H. W., W. VAN WINKLE jr., N. K. KENNEDY and M. C. MORTON: J. of Pharmacol. **68**, 194 (1940). — ³² V. OETTINGEN, W. F., and E. A. JIROUCH: J. of Pharmacol. **42**, 355 (1931). — ³³ OLIVER, J., M. MACDOWELL and A. TRACY: J. Clin. Invest. **30**, 1307 (1951). — ³⁴ SCHNEIDER, W.: Die Pharmazeut. Industrie **1950**, 226. — ³⁵ SMYTH jr., H. F., J. SEATON and L. FISCHER: J. Industr. Hyg. Toxicol. **23**, 259 (1941). — ³⁶ WEATHERBY, J. H., and G. Z. WILLIAMS: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **28**, 12 (1939). — ³⁷ WEGENER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 414 (1953). — ³⁸ WILEY, F. H., W. C. HUEPER, D. S. BERGEN and F. R. BLOOD: J. Industr. Hyg. Toxicol. **20**, 269 (1938).

Vgl. die Übersichtsarbeiten: DOERR, W.: Pathologische Anatomie der Glykolvergiftung und des Alloxandibabetes. Sitzungsberichte d. Heidelberger Akademie d. Wissenschaften, Heidelberg 1949. — LOESER, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 36 (1953). — QUADBECK, G.: Chemiker-Ztg **74**, 91 (1950). — SCHOLZ, J.: Arch. Pharmaz. **277**, 145 (1939). — TAEGER, H.: Slg. Vergiftungsf. **9**, A 3 (1938).

Prof. Dr. med. Dr. phil. ARNOLD LOESER,
Pharmakolog. Institut der Universität Münster/Westfalen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. F. HAHN).

Über Bindung und Elimination von Herzglykosiden in der Leber und Niere von Meerschweinchen.

Von

H. GIERTZ, F. HAHN und R. SCHUNK.

(Eingegangen am 30. Juli 1953.)

Die zahlreichen Untersuchungen über die extrakardiale Verteilung der Herzglykoside im Körper aus älterer (HATCHER u. EGGLESTON; WEESE; DOCK, STOCKTON u. WOOD; HANZLICK u. WOOD; KIESE) und neuerer Zeit (FARAH; FARAH u. SMUSKOWICZ; C. S. FISCHER, SJOERDSMA u. JOHNSON; FRIEDMAN, GEORGE, BINE, BYERS u. BLAND) haben wohl Einigkeit darüber gebracht, daß die Bindungsfähigkeit der Leber besonders hoch ist, während allerdings die spezifische, d. h. pro Gramm Organgewicht berechnete Bindungsfähigkeit des Herzens von älteren Autoren größer, von den neueren jedoch meist als kleiner angegeben wird. Die spezifische Bindungsfähigkeit der Niere, von WEESE der des Herzens gleichgesetzt, erscheint auch nach neueren Untersuchungen hoch (FRIEDMAN usw.), teils aber auch unmeßbar gering (FARAH u. SMUSKOWICZ).

Es scheint ein bisher noch wenig bearbeitetes Problem zu sein, inwieweit in der Verteilung der Glykoside im Körper, insbesondere im Hinblick auf die einzelnen Organe, Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten von Glykosiden bestehen. Lediglich in dem extrakardialen Gesamtverbrauch wurden von WEESE Unterschiede zwischen Digitoxin, Scillaren und G-Strophanthin erwähnt.

ROTHLIN, der auch mit mehreren Glykosiden arbeitete, erwähnt solche Unterschiede nicht. Allerdings gehen aus einer Tabelle seiner Veröffentlichung gewisse Unterschiede zwischen den Glykosiden I. und II. Ordnung in der relativen Bindung ans Herz hervor, worauf auch LENDLE in seinem Handbuchartikel hinweist.

Die neueren Untersuchungen (FARAH; FARAH u. SMUSKOWICZ; GEILING; C. S. FISCHER usw.; GEORGE, BINE u. FRIEDMAN; GEORGE u. FRIEDMAN) bestätigen auch die von HATCHER und EGGLESTON schon gefundene Bedeutung der Leber als Ort der Glykosidelimination. Diese Bedeutung hat die Leber in erster Linie bei Nagetieren, während beim Hund ein großer Teil der Glykoside durch die Niere geht (GEILING; GEORGE, BINE, FRIEDMAN u. BLAND; FRIEDMAN usw.; GEORGE, BINE u. FRIEDMAN). Die artspezifischen Unterschiede in der Bevorzugung der Niere oder Leber als Eliminationsort prägen sich auch in einem Unterschied der Bindung an diese Organe aus (FRIEDMAN usw.).

Die Elimination in der Leber besteht teils in chemischer Zerstörung (C. S. FISCHER usw.; GEORGE, BINE u. FRIEDMAN), teils in Exkretion (HATCHER u. EGGLESTON; FARAH u. SMUSKOWICZ; GEILING; GEORGE, BINE und FRIEDMAN; GEORGE u. FRIEDMAN).

Durch die folgenden Versuche sollte geprüft werden, ob zwischen den verschiedenartigen Glykosiden (k-Strophanthin, Scillaren A, Scillawirkstoff Asta mit 60% Scillirosid und 10% Scillaren B sowie Digitoxin¹⁾) ein Unterschied in der Bindung an die Leber und die Niere sowie der Elimination in diesen Organen besteht. Durch Verwendung von Meerschweinchen wurde gleichzeitig zum erstenmal die Frage der extrakardialen Glykosidverteilung für diese Tierart untersucht. Die Methode zur Messung der Verteilung lehnte sich an die zuerst von ROTHLIN benutzte Methode der Organausschaltung mit Bestimmung der tödlichen Dosis nach HATCHER und BRODY an. Die Eliminationsgröße in den einzelnen Organen ließ sich dabei durch Variation der Infusionsgeschwindigkeit ermitteln, ein Verfahren, das für die Elimination am Ganztier zuerst von HAUPTSTEIN, dann von LENDLE; HEUBNER und NYARY; MEHNERT; HERRE benutzt worden ist. Die von uns angewandte Kombination des ROTHLINSchen und HAUPTSTEINSchen Verfahrens haben vorher schon FARAH und SMUSKOWICZ an Ratten angewandt.

Da die Messung der Elimination am Ganztier ohne Organausschaltung ein notwendiger Bestandteil unserer Versuche war, so lassen sich unsere Ergebnisse auch zur Frage der Elimination der einzelnen Glykoside am Ganztier verwenden und mit den entsprechenden Angaben der Literatur vergleichen.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten 24 Std vorher nüchtern gesetzte Meerschweinchen in Urethannarkose (1,75 g/kg subcutan). Infusion mit der HEUWINGSchen Infusionsspritze in die Vena jugularis. Die Spritze wurde auf folgende Laufgeschwindigkeiten eingestellt: 32, 16, 8, 4, 2, 1, $\frac{1}{2}$ (ml/Std).

Für jede einzelne der mit dem Faktor 2 variierten Geschwindigkeitsstufen wurden Gruppen von Tieren eingesetzt, deren Gewichte über 200 und unter 400 g, im Mittel meist etwas unter 300 g lagen. Wir haben also auf die Einstellung einer individuellen genau in mg/kg/Std definierten Infusionsgeschwindigkeit verzichtet, sondern die Variation der Tiergewichte geringer als die der Infusionsgeschwindigkeiten und die Mittelwerte der Tiergewichte in den einzelnen Versuchsgruppen möglichst wenig abweichend voneinander gehalten.

Die Infusionsgeschwindigkeiten wurden ferner noch durch stufenweise Veränderung der Glykosidkonzentrationen (ebenfalls mit dem Faktor 2) bei gleicher Ganggeschwindigkeit der Infusionsspritze variiert.

Die Organausschaltung erfolgte in 2 Stufen. Als 1. Stufe dienten Tiergruppen, bei denen die Leber und notwendigerweise auch der Darm, als 2. Stufe eine Gruppe, bei der zusätzlich noch die Niere ausgeschaltet wurde. Der Einfachheit halber werden im folgenden die beiden Gruppen als leberlose bzw. als leber- und nierenlose Tiere bezeichnet.

Zur Ausschaltung der Leber und des Darms wurden die Aorta (aus technischen Gründen zusammen mit der unteren Hohlvene) unterhalb der Nierenarterien, aber

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. HOTOVY von der Fa. Merck für die Überlassung des Digitoxins und K-Strophanthins, Herrn Prof. ROTHLIN von der Fa. Sandoz für die Überlassung des Scillaren A und Herrn Doz. Dr. BROCK von der Fa. Asta-Werke für die Überlassung des Scillawirkstoffs aufs herzlichste.

möglichst oberhalb der Arteria mesenterica caudalis, ferner die Arteria coeliaca (von der die Art. hepatica abgeht), schließlich die Arteriae spermaticae (uterinale) unterbunden. Bisweilen mußte die Aorta unterhalb der Art. mesenterica caud. abgebunden werden, wobei dann letztere gesondert ligiert wurde. Bei Abgang der Art. hepatica direkt aus der Aorta erfolgte deren Unterbindung gesondert.

Zu beachten ist, daß bei unserem Vorgehen die Hinterbeine aus der Zirkulation ausgeschlossen wurden. Wir fanden jedoch in besonderen Kontrollversuchen, daß eine isolierte Ausschaltung der Hinterbeine durch Unterbindung der Aorta unterhalb der Mesenterica caudalis keinen meßbaren Einfluß auf den Glykosidtitert hat. Ebenso waren Scheinoperationen ohne sichtbare Wirkung. Wir haben daher im folgenden zum Vergleich mit den leberlosen und leber- und nierenlosen Tieren einfach nur intakte Tiere verwendet.

Für die gleichzeitige Ausschaltung der Niere und Leber genügte es, eine Unterbindung der Aorta oberhalb der Arteria coeliaca (bzw. der Art. hepatica, wenn diese aus der Aorta direkt abging) vorzunehmen. Es wurde allerdings zusätzlich noch die Aorta mit der Cava caudalis unterhalb den Nierenarterien oder Mesenterica caudalis unterbunden im Interesse einer Gleichartigkeit der Versuchsbedingungen.

Wir wurden der durch die Organausschaltung bedingten Verkleinerung des Kreislaufs dadurch in etwa gerecht, daß wir bei den Tieren mit Organausschaltung die Infusionsgeschwindigkeit (meist durch Variation der Ganggeschwindigkeit der Infusionsspritze, teils auch durch Variation der Glykosidkonzentrationen) halb so groß einstellten wie bei den im Vergleich zu ihnen stehenden intakten Tieren.

Die Tiere wurden künstlich beatmet, um Atemstillstand vor dem Herzstillstand zu vermeiden (vgl. hierzu HOFFMANN u. LENDLE; KINUKAWA). Frequenz und Hubhöhe der Atempumpe war für alle Versuche gleich eingestellt.

Bei der Auswertung unserer Versuche haben wir einen Einfluß des Geschlechts (GOLDBERG) auf die Höhe der tödlichen Dosen nicht beobachten können (ähnlich wie DYBING). Wir haben daher aus Raumgründen in den folgenden Tabellen auf eine Wiedergabe des Geschlechts der Tiere verzichtet.

Die Vergiftung des Herzens wurde laufend mit einem direktschreibenden Elektrokardiographen kontrolliert¹. Verwendet wurde der erste, mindestens 4 sec dauernde Herzstillstand, der meist nach sinusförmigen Aktionsströmen auftrat. Wir haben in allen Versuchen auch den endgültigen Herzstillstand festgelegt, kamen aber zu dem Ergebnis, daß infolge einer ungleichen Länge des Terminalstadiums der Glykosidvergiftung dieser Wert erheblich größeren Störungen unterliegt als der Wert für den ersten Herzstillstand. Daher wurde dieser verwertet.

Bei sehr langsamer Infusionsgeschwindigkeit treten die sinusförmigen Ströme meist nicht auf, sondern das Herz schlägt immer langsamer und die Kammerkomplexe im EKG zeigen immer stärker ausgeprägte Schenkelblockbilder. In diesen Fällen wurde als Herzstillstand der Moment gewählt, bei dem die Herzperiode 4 sec betrug. Der endgültige Stillstand lag in diesen Fällen meist nicht viel später.

Für die Herstellung der Infusionslösung diente für sämtliche Glykoside eine 0,1%ige alkoholische Stammlösung, so daß wir für alle Glykoside immer das gleiche Verhältnis Alkohol zu Glykosid hatten. Aus diesen Stammlösungen wurden die verschiedenen Verdünnungen mit RINGER-Lösung hergestellt.

Besonders interessante Beobachtungen konnten wir bei der Verdünnung der Digitoxinlösung über die Löslichkeitsverhältnisse des Digitoxin machen. Wir haben bis auf einige gesondert zu besprechende Versuche die alkoholische Stammlösung nur mit RINGER-Lösung verdünnt. Dabei ergab sich, daß eine Ver-

¹ Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für die Überlassung des direktschreibenden Cardioscripts der Fa. Schwarzer zu großem Dank verpflichtet.

dünnung der 0,1%igen alkoholischen Stammlösung auf das 2½fache (1:2500 Digitoxin mit einem Alkoholgehalt = 40%) möglich war, ohne daß Digitoxin ausfiel. Eine Verdünnung auf das 5fache (1:5000 Digitoxin mit einem Alkoholgehalt = 20%) und 10fache (1:10000 Digitoxin mit einem Alkoholgehalt = 10%) war nicht mehr möglich, weil nach einigen Stunden Digitoxin auskristallisierte. Die Kristallisation war um so stärker, je niedriger die Raumtemperatur war, so daß wir mit solchen Lösungen an verschiedenen Tagen je nach der Außentemperatur ungleiche Werte erhielten. Versuche mit diesen Verdünnungen wurden daher ausgeschaltet. Eine Lösung von 1:20000 Digitoxin mit einem Alkoholgehalt = 5% war aber wieder brauchbar, sofern die Lösung bei Zimmertemperatur oder in der Kälte aufbewahrt wurde. Interessanterweise erfolgte auch hier noch nach 8—12 Std ein Ausfallen von Digitoxin, wenn die Lösung auf über 30° gehalten wurde. Zur Sicherheit wurden diese Verdünnungen (wie übrigens auch alle anderen Verdünnungen) nur in ganz frischem Zustand verwendet. Auch die Lösung der übrigen Glykoside wurde nie länger als 12 Std nach der Verdünnung verwandt. Ging die Verdünnung auf 1:40000 Digitoxin herunter (Alkoholgehalt von 2,5%), so war diese Lösung auch bei höheren Temperaturen haltbar.

Wir finden also bei fortgesetzter Verdünnung einer alkoholischen Stammlösung von Digitoxin mit RINGER-Lösung (auch mit Aqua dest.) eine zwischen 1:5000 und 1:20000 liegende Zone, wo das Digitoxin unlöslich ist. Diese Unlöslichkeit wird durch Erwärmung begünstigt und ist an den Grenzen dieser Zone nur in der Wärme nachweisbar.

Wir können nicht entscheiden, inwieweit es sich hier um eigentümliche Entmischungserscheinungen des aus Alkohol, Wasser und Digitoxin bestehenden ternären Systems handelt. Möglicherweise ist die paradoxe Temperaturabhängigkeit der Auskristallisierung dadurch bedingt, daß Erwärmen die Bildung von Kristallisationskeimen begünstigt, im Gegensatz zu der durch Kälte begünstigten eigentlichen Kristallbildung.

Denkbar wäre auch, daß in den Lösungen eine durch Wärme begünstigte Spaltung von Digitoxin mit geringerer Löslichkeit der Spaltprodukte stattfände. Wir konnten aber feststellen, daß die ausgefallenen Kristalle nach Schmelzpunkt und Kristallform dem Digitoxin entsprechen.

Ergebnisse.

1. Digitoxinversuche.

Die in Tab. 1 niedergelegten Versuche mit hohen Digitoxinkonzentrationen zeigen, daß die tödlichen Digitoxindosen am intakten Tier mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit eine steigende Tendenz haben, bei dem leberlosen Tier dagegen stetig abfallen. Die vom Digitoxin bekannte Latenz der Wirkung, die bei rascher Infusion zur Übertitration führt, ist hier also nur am leberlosen Tier sichtbar. Da sie aber als ein der Elimination gegenläufiger Faktor auch in den Ergebnissen am intakten Tier enthalten ist, so folgt, daß durch die Methode der Dauerinfusion mit wechselnder Geschwindigkeit die Elimination am Ganztier nur unzulänglich erfaßt wird. Erst durch Subtraktion der am intakten und leberlosen Tier erhaltenen Ergebnisse wird die wahre Größe der Elimination, zugleich bezogen auf die Leber als Eliminationsorgan, wiedergegeben.

Setzt man die am leberlosen Tier ermittelten tödlichen Dosen gleich 1 und bezieht hierauf die am intakten Tier ermittelten Dosen, so nimmt der

auf diese Weise für die Leber ermittelte Eliminationsfaktor von der 2. Versuchsgruppe der Tab. 1 ab annähernd in arithmetischer Progression zu, wenn die Infusionsgeschwindigkeit in geometrischer Progression abnimmt.

Die Bindung des Digitoxins an die Niere ist nur gering. Während schon bei der raschesten Infusionsgeschwindigkeit die Leber mindestens die gleiche Menge wie der Restkörper bindet, beträgt die Bindung an die Niere nur rund 3% der von dem leberlosen Tier gebundenen Menge.

Die Versuche in Tab. 2 wurden mit wesentlich stärkeren Digitoxinverdünnungen ausgeführt. Die Infusionsgeschwindigkeiten der 3 Versuchsgruppen 1, 2, 3 korrespondieren mit den Infusionsgeschwindigkeiten der entsprechenden Versuchsgruppen der Tab. 1.

Die tödlichen Dosen liegen hier fast alle mehr oder weniger höher als in Tab. 1, was wir als Effekt der größeren Flüssigkeitsmengen deuten. Die abfallende Tendenz der tödlichen Dosen bei den leberlosen Tieren ist hier nur zwischen der 1. und 2. Geschwindigkeitsstufe vorhanden. Die Zunahme der tödlichen Dosen am intakten Tier erscheint dagegen hier noch deutlicher ausgeprägt als in Tab. 1. Die tödlichen Dosen lagen dabei in einigen Versuchen bei langsameren Infusionsgeschwindigkeiten so hoch, daß die Versuche vor Erreichung des Endergebnisses abgebrochen werden mußten (in der Tabelle durch > gekennzeichnet).

Die als Quotient aus Digitoxinverbrauch am intakten und leberlosen Tier errechnete Bindung an die Leber, d. h. die Elimination in der Leber, scheint auch hier bei geometrischer Abnahme der Infusionsgeschwindigkeit mit arithmetischer Progression zuzunehmen, wenn man berücksichtigt, daß die beiden letzten Mittelwerte am intakten Tier nur Minimalwerte darstellen.

Die Bindung an die Niere zeigt mit 3—6% des Digitoxinaufbrauchs am leberlosen Tier die gleichen geringen Werte wie in Tab. 1. Außerdem ergibt sich hier, daß innerhalb der Versuchszeit bei abnehmender Infusionsgeschwindigkeit eine signifikante Zunahme der Bindung an die Niere, d. h. eine Elimination in der Niere, nicht stattfindet.

2. *k-Strophanthinversuche.*

Nach Tab. 3 erfolgt auch hier mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit eine Zunahme der tödlichen Dosen am intakten Tier mit Ausnahme des Übergangs von der 3. zur sehr langsamen 4. Stufe der Infusionsgeschwindigkeit. Am leberlosen Tier nehmen die Werte zunächst ab, um dann konstant zu bleiben.

Die an die Leber gebundene Strophanthinmenge beträgt bei raschester Infusion etwa $\frac{3}{4}$ des am leberlosen Tier gebundenen Strophanthins, also etwas weniger als beim Digitoxin. Ebenso ist die Zunahme der von der Leber gebundenen Menge, wieder ausgedrückt durch das Verhältnis von

Tab. 1. *Digitoxinversuche*.

Tödliche Dosen in Tab. 1—7 in mg/kg Körpergewicht. Bei der Digitoxinkonzentration 1:5000 in Versuchsgruppe 4 betrug der Alkoholgehalt 40%.

Versuchsgruppe	1				2				3				4			
	Leber		Leber Niere		—		Leber		—		Leber		—		Leber	
Organausschaltung	—		—		—		—		—		—		—		—	
Glykosidkonzentration	1:2500		—		—		1:2500		—		1:2500		—		1:2500	
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	4		2		2		1		1		1		1		1:5000	
Zahl der Tiere	20		10		20		10		20		10		20		10	
Mittelwerte	1,248		0,587		1,144		0,524		1,947		0,458		2,081		0,347	
σ	$\pm 0,282$		$\pm 0,090$		$\pm 0,233$		$\pm 0,123$		$\pm 0,765$		$\pm 0,126$		$\pm 0,585$		$\pm 0,116$	
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen	2,12		1		2,19		1		4,27		1		6,0		1	
Mittleres Tiergewicht	273		256		265		276		280		250		284		266	
mit max. Abweichung	205—315		205—350		210—340		220—360		230—345		210—305		230—330		240—285	

Tab. 2. *Digitoxinversuche*.

Versuchsgruppe	1				2				3			
	Leber		Leber Niere		—		Leber		Leber Niere		—	
Organausschaltung	—		—		—		—		—		—	
Glykosidkonzentration	1:20000		—		—		1:40000		—		1:40000	
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	32		16		32		16		16		16	
Zahl der Tiere	10		7		4		15		10		10	
Mittelwerte	1,336		0,608		0,552		$\sim 1,866$		0,516		$> 2,713$	
σ	$\pm 0,209$		$\pm 0,075$		$\pm 0,094$		$\pm 0,108$		$\pm 0,092$		$\pm 0,101$	
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen	2,2		1		0,97		$\sim 3,62$		1		$> 5,25$	
Mittleres Tiergewicht	287		356		303		263		293		279	
mit max. Abweichung	235—350		290—400		260—350		220—330		205—400		230—330	

Tab. 3. *k-Strophanthin*versuche.

Versuchsgruppe	1		2		3		4	
	—	Leber 1:20000	—	Leber 1:20000	—	Leber 1:20000	—	Leber 1:20000
Organausschaltung								
Glykosidkonzentration								
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	16	8	8	4	4	2	2	1
Zahl der Tiere	10	10	10	10	10	10	5	5
Mittelwerte	0,571	0,324	0,628	0,261	0,754	0,262	0,714	0,255
σ	$\pm 0,103$	$\pm 0,062$	$\pm 0,251$	$\pm 0,069$	$\pm 0,144$	$\pm 0,058$	$\pm 0,046$	$\pm 0,021$
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen	1,76	1	2,4	1	2,87	1	2,80	1
Mittleres Tiergewicht	303	300	281	291	295	285	277	258
mit max. Abweichung	255—365	230—375	240—320	250—340	245—325	230—315	245—300	235—270

Tab. 4. *k-Strophanthin*versuche.

Versuchsgruppe	1		2		3	
	Leber	Leber Niere	—	Leber	Leber Niere	Leber Niere
Organausschaltung						
Glykosidkonzentration	1:40000			1:80000		1:80000
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	32	16	32	16	16	8
Zahl der Tiere	10	10	10	10	10	15
Mittelwerte	0,660	0,394	0,720	0,322	0,235	0,217
σ	$\pm 0,078$	$\pm 0,052$	$\pm 0,061$	$\pm 0,036$	$\pm 0,024$	$\pm 0,101$
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen	1,67	1	2,23	1	0,73	1
Mittleres Tiergewicht	270	286	255	310	309	264
mit max. Abweichung	205—335	230—325	210—370	245—365	230—310	210—355

Bindung am intakten und leberlosen Tier, kleiner. Selbst bei 4facher Abnahme der Infusionsgeschwindigkeit (zwischen Versuchsgruppe 1 und 3) beträgt die Zunahme nur weniger als 50%

Die gleichen Ergebnisse haben wir auch in Tab. 4, wo die Strophanthinversuche durchweg mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt wurden. Die tödlichen Dosen liegen allerdings hier, wie bei den Digitoxinversuchen mit geringerer Konzentration, durchweg höher als in Tab. 3. Sie nehmen am intakten Tier mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit zu, am leberlosen Tier zunächst ab, um dann konstant zu bleiben. Die zur Bindung des Strophanthins an das leberlose Tier in Beziehung gesetzte Bindung am intakten Tier steigt hier zwar bei abnehmender Infusionsgeschwindigkeit deutlicher an als in Tab. 3 (bei korrespondierenden Infusionsgeschwindigkeiten in den Versuchsgruppen 1, 2 und 3). Aber dieser Anstieg erreicht doch nicht den Gradienten der Digitoxin-elimination. Bei 4fach verlangsamter Infusionsgeschwindigkeit nimmt der Quotient aus den tödlichen Dosen am intakten und leberlosen Tier knapp um das Doppelte zu.

Bei dem Übergang zu der langsamsten Infusion ist in Tab. 3 eine Zunahme der Elimination nicht mehr festzustellen.

Viel stärker ist jedoch die Bindung des Strophanthins im Vergleich zu Digitoxin an die Niere (26—31% der von dem leberlosen Tier verbrauchten Glykosidmenge, d. h. nicht sehr viel weniger als die Hälfte von dem, was die Leber am intakten Tier bei raschester Infusion bindet). Eine Elimination durch die Niere, d. h. eine Zunahme der Bindung an die Niere mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit ist jedoch nicht sicher nachweisbar.

3. *Scillarenversuche.*

Aus Tab. 5 geht hervor, daß bei Versuchen mit Scillaren A die tödlichen Dosen nicht nur am leberlosen Tier, sondern auch am intakten Tier im Gegensatz zu dem Verhalten des Digitoxins und Strophanthins mit abnehmender Infusionsgeschwindigkeit laufend abnehmen. Bemerkenswert ist nun, daß dabei der Quotient aus den tödlichen Dosen der intakten und leberlosen Tiere praktisch nahezu konstant bleibt, so daß eine Elimination innerhalb der von uns eingehaltenen Versuchszeit im Gegensatz zu den anderen Glykosiden in der Leber nicht nachweisbar ist. Trotzdem ist die Bindung an die Leber nicht gering. Sie liegt sogar etwas höher als die für Strophanthin bei der raschesten Infusion ermittelte Größe.

Die Bindung an die Niere ist mit 17—20% der vom leberlosen Tier verbrauchten Glykosiddosis deutlich größer als beim Digitoxin und kleiner als beim Strophanthin. Sie ist, wie bei den anderen Glykosiden, anscheinend unabhängig von der Infusionsgeschwindigkeit.

Tab. 5. *Scillaren A-Versuche.*

Versuchsgruppe	1				2				3			
	Leber	Leber Niere	—	Leber	Leber	Leber	Leber Niere	—	Leber	Leber	Leber Niere	—
Organausschaltung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glykosidkonzentration	1:20000	1:40000	1:40000	1:40000	1:40000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:160000	1:160000	1:160000
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std .	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Zahl der Tiere	11	10	6	6	13	10	10	5	10	10	10	10
Mittelwerte	0,455	0,246	0,204	0,204	0,387	0,186	0,151	0,308	0,170	0,135	0,135	0,135
σ	$\pm 0,076$	$\pm 0,028$	$\pm 0,025$	$\pm 0,025$	$\pm 0,033$	$\pm 0,019$	$\pm 0,022$	$\pm 0,011$	$\pm 0,028$	$\pm 0,024$	$\pm 0,024$	$\pm 0,024$
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen . . .	1,85	1	0,83	0,83	2,08	1	0,81	1,81	1	0,8	0,8	0,8
Mittleres Tiergewicht	264	291	268	268	289	284	270	264	276	271	271	271
mit max. Abweichung	200—320	220—400	245—315	245—315	220—385	230—345	200—320	245—280	220—350	220—315	220—315	220—315

Tab. 6. *Scillaren A-Versuche.*

Versuchsgruppe	1				2				3				4			
	Leber	Leber	—	Leber	Leber	Leber	Leber	—	Leber	Leber	—	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber
Organausschaltung	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glykosidkonzentration	1:40000	1:40000	1:40000	1:40000	1:40000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000	1:80000
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	32	16	32	16	32	16	16	16	8	8	16	16	8	8	8	8
Zahl der Tiere	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	15	15	10	10	10	10
Mittelwerte	0,544	0,292	0,434	0,292	0,434	0,210	0,307	0,155	0,155	0,155	0,321	0,321	0,157	0,157	0,157	0,157
σ	$\pm 0,087$	$\pm 0,037$	$\pm 0,056$	$\pm 0,037$	$\pm 0,056$	$\pm 0,021$	$\pm 0,053$	$\pm 0,028$	$\pm 0,028$	$\pm 0,028$	$\pm 0,049$	$\pm 0,049$	$\pm 0,017$	$\pm 0,017$	$\pm 0,017$	$\pm 0,017$
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen	1,86	1	2,06	1	2,06	1	1,98	1	1	1	2,04	2,04	1	1	1	1
Mittleres Tiergewicht	244	259	288	259	288	279	276	248	248	248	270	270	257	257	257	257
mit max. Abweichung	200—320	230—310	230—380	230—310	230—380	200—365	250—305	210—310	210—310	210—310	225—320	225—320	210—290	210—290	210—290	210—290

Dieses Ergebnis wird durch die Versuche in Tab. 6 bestätigt, die sich technisch durch kleine aus der Tabelle hervorgehende Einzelheiten von den Versuchen der vorhergehenden Tabellen unterscheiden. Nierenlose Tiere fehlen hier. Die Infusionsgeschwindigkeiten wurden hier noch durch eine 4. besonders langsame Stufe erweitert. Die Abnahme der tödlichen Dosen am intakten wie am leberlosen Tier bei abnehmender Infusionsgeschwindigkeit geht hier bis zu der Geschwindigkeitsstufe 3.

4. Versuche mit dem Scillawirkstoff Asta.

Das Ergebnis stimmt gut mit den Scillarenversuchen überein (Tab. 7), sowohl hinsichtlich der Abnahme der tödlichen Dosen am intakten und leberlosen Tier bei Abnahme der Infusionsgeschwindigkeit wie auch hinsichtlich der fehlenden Nachweisbarkeit einer Elimination innerhalb der gleichen Versuchszeiten. Auch die prozentuale Verteilung der Wirkstoffe auf Leber, Niere und Restkörper entspricht praktisch derjenigen des Scillaren A. Bei dem Übergang von der vorletzten auf die letzte Infusionsstufe nehmen die Werte am intakten Tier zu, was andeutungsweise auch bei den Scillarenversuchen der Tab. 6 der Fall ist. Die Zunahme der Bindung an die Leber und an die Niere ist allerdings nicht signifikant.

Berechnung der Eliminationsrate.

Analog HAUPTSTEIN und HOFFMANN und LENDLE haben wir die Eliminationsrate ermittelt, indem wir die Differenz aus den mittleren tödlichen Dosen am Ganztier bei zwei verschiedenen mittleren Infusionsgeschwindigkeiten (das sind die Mittelwerte in den vorausgehenden Tabellen) durch die Differenz der mittleren Infusionszeiten dividierten. Die mittleren Infusionszeiten (in min/kg) ergaben sich aus der Spritzen- geschwindigkeit, der Konzentration der Lösung und der mittleren tödlichen Dosis. Wir gingen dabei von der Versuchsgruppe aus, die die kleinste tödliche Dosis aufwies. In Tab. 2, 3 und 4 war dies die 1., in der Tab. 1 die 2. Gruppe. Zur Differenzbildung diente einmal die nächstfolgende, dann aber auch noch die übernächste und, wenn vorhanden, noch eine weitere Versuchsgruppe. So ergaben sich jeweils 2, im Falle des Strophanthins aus Tab. 3 (aus Versuchsgruppe 1 und 4) 3 verschiedene Eliminationsraten.

Außerdem wurde noch eine zweite Eliminationsrate ermittelt, die sich nicht auf das Ganztier, sondern auf die Leber bezieht. Hierzu wurde die Differenz der von der Leber bei 2 verschiedenen mittleren Infusionsgeschwindigkeiten gebundenen mittleren Glykosidmengen durch die Differenz der mittleren Infusionszeiten dividiert. Die von der Leber im Mittel bei einer bestimmten mittleren Infusionsgeschwindigkeit gebundene Glykosidmenge errechnete sich aus der Differenz der entsprechenden Mittelwerte am Ganztier und am leberlosen Tier. Dieser

Tab. 7. Versuch mit Scillawirkstoff.

Versuchsgruppe	1		2		3	
	Leber	Leber Niere	—	Leber	—	Leber Niere
Organausschaltung	—	—	—	1:20000	—	1:20000
Glykosidkonzentration	16	8	4	2	2	1
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std .	10	10	15	15	14	14
Zahl der Tiere	0,539	0,242	0,417	0,232	0,477	0,173
Mittelwerte	$\pm 0,060$	$\pm 0,033$	$\pm 0,117$	$\pm 0,055$	$\pm 0,151$	$\pm 0,048$
σ						
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberlose Tiere bezogen . . .	1,80	0,81	1,80	1	2,20	0,80
Mittleres Tiergewicht	258	268	254	255	260	268
mit max. Abweichung.	220—330	230—340	205—320	220—340	205—320	220—370

Tab. 8. Eliminationsraten in mg/kg/Std.

Die Prozentzahlen bedeuten die Eliminationsraten pro kleinster tödlicher Dosis am intakten (obere Reihe) bzw. leberlosen Tier (untere Reihe).

	Aus Tab. 1		Aus Tab. 2	
	Digitoxin			
Differenz der Infusionszeiten in min/kg . . .	293—86		139—50	
am intakten Tier	0,235	20,5%	0,104	9,1%
in der Leber	0,254	73 %	0,124	36 %
			0,356	26,6%
			0,419	81 %
			0,232	17,4%
			0,248	48 %

Wert bezieht sich dann natürlich auf Kilogramm Körpergewicht, nicht Lebergewicht.

Aus der Tab. 8 geht hervor, daß die auf diese Weise errechneten Eliminationsraten¹ größer sind als die für das intakte Tier errechneten. Dieser Befund erklärt sich dadurch, daß bei der Differenzbildung aus den Befunden am intakten und leberlosen Tier der der Elimination gegenläufige Faktor der Übertitration wegfällt. Die von uns für Digitoxin bei kleinerer Zeitdifferenz ermittelte Eliminationsrate von 0,235 mg/kg/Std am intakten Tier stimmt gut mit dem von HOFFMANN und LENDLE ermittelten Wert von 0,241 mg/kg/Std überein. Zugleich zeigen alle unsere Versuche, daß bei Verlängerung der Infusionszeit ein Abfall der Eliminationsrate stattfindet. Allerdings scheint kein strenger Parallelismus zu bestehen. Insbesondere fällt bei den Strophanthinversuchen auf, daß bei besonders langer Infusion der Abfall der Eliminationsrate stärker ist als der Abfall der Infusionsgeschwindigkeit, während zunächst der Abfall der Eliminationsrate geringer zu sein scheint als der Abfall der Infusionsgeschwindigkeit. Eine ähnliche Abnahme der Eliminationsrate bei sehr langsamen Infusionen ergibt sich auch aus den Versuchen von ÖSTLING für g-Strophanthin beim Meerschweinchen.

In der Tabelle sind außerdem die Eliminationsraten in Beziehung zur kleinsten tödlichen Dosis gesetzt, und zwar in der oberen Reihe zur tödlichen Dosis am Ganztier, in der unteren Reihe am leberlosen Tier. Man sieht auch bei dieser Berechnung, daß die Elimination des Digitoxins rascher erfolgt als die des k-Strophanthins, wenn man die in vergleichbaren Zeitabschnitten errechneten Werte miteinander vergleicht.

5. Über den Einfluß des Alkohols auf die Wirkung und Elimination der Glykoside.

Wie eingangs erwähnt, haben wir uns in unseren Versuchen bemüht, den Alkoholgehalt der Infusionslösungen auch in den Digitoxinversuchen niedrig zu halten. Die in der Literatur vielfach für Digitoxinversuche verwendeten höheren Alkoholgehalte sind in der Tat nicht ohne Bedeutung. Die Tab. 9 läßt erkennen, daß bei Verwendung einer Digitoxinlösung von 1:40000 mit einem 10%igen Alkoholgehalt die tödlichen Dosen am intakten Tier durchweg niedriger liegen als die in Klammern aus Tab. 2 angeführten Werte, die mit einem Alkoholgehalt von 2,5% bei gleicher Digitoxinkonzentration erhalten waren. Interessanterweise sind die tödlichen Dosen an den leberlosen Tieren bei höherem Alkoholgehalt dagegen etwas erhöht. Diese Feststellungen gelten für zwei verschiedene Infusionsgeschwindigkeiten.

Die auf die Leber bezogene Eliminationsrate bei 10%igem Alkohol beträgt 0,146 mg/kg/Std statt $\sim$ 0,190 mg/kg/Std. Es wird also nicht nur

¹ Diese Eliminationsrate wurde auch in mg/kg Körpergewicht/Std angegeben.

Tab. 9. Versuche mit einem Alkoholgehalt der Infusionslösung von 10%.

Versuchsgruppe	1		2		3	
	Digitoxin		k-Strophanthin			
Organausschaltung	—	Leber	—	Leber	—	Leber
Glykosidkonzentration	1:20000		1:40000		1:80000	
Spritzengeschwindigkeit in ml/Std	32	16	16	8	16	8
Zahl der Tiere	10	6	10	10	10	10
Mittelwerte	1,535 (~1,866) ¹	0,582 (0,516) ¹	1,926 (~2,713) ¹	0,550 (0,516) ¹	0,689 (1,013) ¹	0,398 (0,317) ¹
σ	$\pm 0,208$	$\pm 0,123$	$\pm 0,442$	$\pm 0,126$	$\pm 0,139$	$\pm 0,073$
Verhältnis der tödlichen Dosen, auf leberloses Tier bezogen.	2,64 (~3,62) ¹	1	3,50 (~5,25) ¹	1	1,73 (3,20) ¹	1
Mittleres Tiergewicht	256	298	270	270	263	259
mit max. Abweichung.	230—290	270—370	235—345	220—330	240—300	225—300

¹ Entsprechende Werte aus Tab. 2 bzw. 3.

die Bindung, sondern dazu auch die Elimination in der Leber durch Alkohol herabgesetzt.

Ähnliche Versuche mit k-Strophanthin ergaben ebenfalls bei 10%igem Alkoholgehalt am intakten Tier eine beträchtlich niedrigere tödliche Dosis als bei niedrigerem (1,25%) Alkoholgehalt. Am leberlosen Tier war es wieder umgekehrt. Versuche mit verschiedenen Infusionsgeschwindigkeiten wurden hier nicht vorgenommen.

Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse.

Die starke Bindung der Glykoside an die Leber steht in Einklang mit den eingangs erwähnten Angaben. Neu sind die von uns gefundenen Unterschiede in der Bindung der verschiedenen Glykoside an die Leber: Digitoxin > Scillaren > Strophanthin. Diese Reihenfolge stimmt bemerkenswerterweise überein mit der Reihenfolge der Bindung an die Serumalbumine (ROTHLIN). Vielleicht erklärt sich der Befund durch die Bedeutung, die die Leber als Ort der Albuminbildung und Albuminspeicherung hat.

Auffallend ist auch, daß die Reihenfolge der Glykoside hinsichtlich ihrer Bindung an die Niere umgekehrt verläuft. Es wäre denkbar, daß ein gewisses reziprokes Verhältnis zwischen Leber- und Nieren-

bindung (bzw. Elimination) besteht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß HATCHER und EGGLESTON eine verstärkte Nierenausscheidung nach Gallengangsunterbindung festgestellt haben.

Die starke Bindung des k-Strophanthins an die Niere des Meerschweinchens findet sich nicht für g-Strophanthin in den Rattenversuchen von FARAH und SMUSKOWICZ. Ebenso fällt auf, daß FRIEDMAN usw. eine starke spezifische Digitoxinbindung an die Ratten- und Kaninchenniere beobachteten, die allerdings bei der Ratte (nicht beim Kaninchen) erheblich geringer als die spezifische Bindung an die Leber war.

Aus unseren Versuchen ergibt sich, daß die spezifische Bindung an die Niere (bei Annahme, daß das Lebergewicht etwa das 4fache der Nierengewichte beträgt) bei Digitoxin maximal, d. h. bei raschester Infusion, $\frac{1}{8}$, bei k-Strophanthin maximal rund $1\frac{1}{4}$ und bei Scillaren A etwa $\frac{1}{1}$ der spezifischen Leberbindung beträgt.

Für unsere Methode der Eliminationsbestimmung fällt unseres Erachtens der Einwand fort, der neuerdings von ÖSTLING gegen die Methode der Dauerinfusion mit wechselnden Infusionsgeschwindigkeiten gemacht worden ist. Danach soll das Ergebnis deshalb ungenau sein, weil neben dem Abbau der Glykoside noch die von der Zeitdauer in anderer Weise abhängige Entwicklung der toxischen Reaktionen von Bedeutung ist. Soweit es sich hierbei um die wohl in erster Linie in Betracht kommende toxische Reaktion am Herzen handelt, fällt diese durch die Differenzbildung zwischen den tödlichen Dosen am normalen und leberlosen Tier weg und beeinflusst somit die Berechnung der Eliminationsvorgänge in der Leber nicht.

Wir stimmen mit ÖSTLING darin überein, daß die toxischen Erscheinungen bei langsamer Infusion häufig anders verlaufen als bei rascher Infusion (siehe Methodik). Wir haben insbesondere bei sehr langsamer Infusion in den Digitoxinversuchen die Beobachtung gemacht, daß toxische Erscheinungen im EKG (Extrasystolen) trotz länger dauernder Infusion wieder verschwanden und einem normalen Sinusrhythmus Platz machten. Wir haben für diese Beobachtung vorläufig noch keine Erklärung.

Unsere Ergebnisse lassen sich natürlich auch mit den lediglich an intakten Tieren durchgeführten Dauerinfusionsversuchen anderer Autoren vergleichen. Es ergibt sich dabei allerdings insofern ein Widerspruch, als im allgemeinen die Elimination des Digitoxins kleiner als die des Strophanthins zu sein scheint. Jedenfalls trifft das nach HOFFMANN und LENDLE sowie HERRE auch für das Meerschweinchen bei Verwendung des g-Strophanthins zu. Da allerdings nach MEHNERT das g-Strophanthin wenigstens bei der Ratte besser als das k-Strophanthin eliminiert wird, ist es noch nicht sicher erwiesen, ob dieser Gegensatz wirklich besteht. Immerhin geht aus den Versuchen von MEHNERT sowie HEUBNER und NYARY hervor, daß bei der Ratte auch das k-Strophanthin besser eliminiert wird als das Digitoxin. Weitere Untersuchungen müssen entscheiden, ob die von uns am Meerschweinchen gefundene geringere Elimination des k-Strophanthins im Vergleich zu Digitoxin für diese Tierart spezifisch ist.

Für Unterschiede im Abbau der einzelnen Glykoside bei verschiedenen Tierarten spricht z. B. die Tatsache, daß nach LENDLE der Abbau des g-Strophanthins an Kaninchen gleich dem des Digitoxins ist, während bei Katzen wiederum das g-Strophanthin rascher abgebaut wird. Auch die von MEHNERT behauptete stärkere Entgiftung des g-Strophanthins gegenüber k-Strophanthin bei Ratten ist anscheinend abhängig von der Tierart, da LENDLE bei Katzen das umgekehrte fand.

Zur Deutung der Widersprüche zwischen der Literatur und unseren Versuchen muß aber auch berücksichtigt werden, daß am intakten Tier der Übertitrations-

effekt die Elimination überdecken kann. Gerade beim Digitoxin, wo in unseren Versuchen am leberlosen Tier in Übereinstimmung mit HERRE, HILDEBRANDT, STRAUB der Übertitrationseffekt am stärksten ist, könnte dieser Umstand dafür verantwortlich sein, daß anderen Autoren die relativ starke Elimination des Digitoxins beim Meerschweinchen entgangen ist, während bei unserer Berechnung der Elimination in der Leber der Übertitrationsfaktor herausfällt. Auf diesen Gesichtspunkt in Zukunft mehr zu achten, erscheint bei der Eliminationsbestimmung mit Hilfe der Dauerinfusion besonders geboten.

In einem einstweilen nicht zu deutenden Gegensatz zu uns steht die von HAUPTSTEIN an Kaninchen, von HEUBNER und NYARY an Ratten und von HERRE an Meerschweinchen für Scillaglykoside gefundene deutliche Elimination.

Die starke Entgiftung des Digitoxins in unseren Versuchen steht schlecht im Einklang mit der im Vergleich zu anderen Glykosiden stärkeren Kumulationsneigung des Digitoxins. Wenn man heute auch die Digitaliskumulation als eine Wirkungskumulation (BAUER; HILDEBRANDT) ansieht, so bringt man doch oft die funktionelle Nachwirkung mit der Verweildauer im Herzen in Zusammenhang. Eine Möglichkeit der Erklärung wäre die, daß Digitoxin beim Meerschweinchen durch die Leber teilweise ausgeschieden und vom Darm rückresorbiert wird und so durch einen enterohepatischen Kreislauf kumulierend wirkt. Gegen diese Vorstellung spricht allerdings, daß nach HOROVY beim Meerschweinchen Digitoxin bei peroraler und intraduodenaler Applikation nur sehr mangelhaft resorbiert wird.

Auffallend ist, daß keine Elimination von Scillaren und Scillirosid in der Leber und Niere nachweisbar ist.

Nach einer persönlichen Mitteilung von LENDLE wird das dem Scillaren nahe verwandte Transvaalin in der Leber eliminiert. Es dürfte hinsichtlich des Abbau-mechanismus von Interesse sein, welche chemischen Unterschiede für das gegensätzliche Verhalten von Transvaalin und Scillaglykosiden verantwortlich sind.

Es wäre denkbar, daß das Fehlen einer Elimination des Scillarens durch die Leber dazu führt, daß es stärker durch die Niere ausgeschieden wird, wenn auch unsere Versuche (vielleicht infolge zeitlich nicht genügender Ausdehnung) hierfür keine Hinweise bringen. Man könnte aber auf diese Weise eine Erklärung für die klinisch immer wieder behauptete stärkere diuretische Wirkung des Scillarens haben.

Die Beobachtungen über den Einfluß des Alkohols auf die tödlichen Glykosid-dosen und die Bindung der Glykoside in der Leber zeigen, daß man in Zukunft besonders bei Digitoxinversuchen mehr auf den Alkoholgehalt der Lösungen achten muß als bisher. Die Beobachtungen werden zur Zeit von uns auf andere Narkotica, Lebergifte und Metaboliten ausgedehnt.

Zusammenfassung.

1. Durch Infusionsversuche nach HATCHER am Meerschweinchen mit und ohne Ausschaltung von Leber (einschließlich Darm) sowie Leber + Niere wurde gefunden, daß die Bindung von Herzglykosiden an die Leber in der Reihenfolge Digitoxin > Scillaren A > k-Strophanthin und die Bindung an die Niere in der Reihenfolge k-Strophanthin > Scillaren A > Digitoxin abnimmt. Ähnlich wie Scillaren A verhält sich Scillawirkstoff Asta mit 60% Scillirosid und 10% Scillaren B.

2. Durch Wechsel der Infusionsgeschwindigkeit wurde festgestellt, daß Digitoxin rascher als k-Strophanthin in der Leber des Meerschweinchens eliminiert wird, während Scillaren A sowie der Scillawirkstoff eine Elimination innerhalb der gleichen Versuchszeit nicht zeigen.

3. Eine Elimination in der Niere war in den entsprechenden Versuchszeiten für alle drei Glykoside nicht festzustellen.

4. Es wird darauf hingewiesen, daß am intakten Tier die Eliminationsvorgänge durch den gegenläufigen Faktor der Bindungsgeschwindigkeit ungenau erfaßt werden, während das hier eingeschlagene Vorgehen die Eliminationsvorgänge in bestimmten Organen genauer zu erfassen vermag.

5. Bei sehr langsamer Infusion ändert sich elektrokardiographisch der Ablauf des Vergiftungsbildes gegenüber rascher Infusion.

6. Bei Infusion verdünnterer Lösungen war besonders bei Digitoxin und k-Strophanthin eine Erhöhung der tödlichen Dosen gegenüber den Werten bei konzentrierter Lösung festzustellen.

7. Eine Erhöhung des Alkoholgehaltes setzte bei k-Strophanthin und Digitoxin die Bindung an die Leber und dadurch die tödlichen Dosen am Ganztier herab. An leberlosen Tieren war eine Vergrößerung der tödlichen Dosen festzustellen. Bei Digitoxin ließ sich auch eine Abnahme der Eliminationsgröße durch Erhöhung des Alkoholgehaltes feststellen (bei k-Strophanthin nicht geprüft).

Literatur.

BAUER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **172**, 699 (1933). — DOCK, W., A. B. STOCKTON and D. A. WOOD: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **25**, 278 (1928). — DYBING, F., and O. DYBING: Acta pharmac. tox., K'hvn. **3**, 189 (1947). — FARAH, A.: J. of Pharmacol. **86**, 248 (1946). — FARAH, A., and E. SMUSKOWICZ: J. of Pharmacol. **96**, 139 (1949). — FISCHER, C. S., A. SJOERDSMA and R. JOHNSON: Circulation (New York) **5**, 496 (1952). — FRIEDMAN, M., S. ST. GEORGE, R. BINE, S. O. BYERS and C. BLAND: Circulation (New York) **6**, 367 (1952). — GEILING, E. M. K.: Med. Ann. Distr. Columbia **20**, 197 (1951). — GEORGE, S. ST., R. BINE and M. FRIEDMAN: Circulation (New York) **6**, 661 (1952). — GEORGE, S. ST., R. BINE, M. FRIEDMAN and C. BLAND: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 504 (1951). — GEORGE, S. ST., and M. FRIEDMAN: Circulation (New York) **6**, 851 (1952). — GOLDBERG, L.: Arch. internat. Pharmacodynamie **78**, 17 (1949). — HANZLICK, P. J., and D. A. WOOD: J. of Pharmacol. **37**, 67 (1929). — HATCHER, R., and I. BRODY: Amer. J. Pharmacy **82**, 360 (1910). — HATCHER, R., and C. EGGLESTON: J. of Pharmacol. **12**, 405 (1919). — HAUPTSTEIN, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **126**, 121 (1927). — HERRE, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **184**, 716 (1937). — HEUBNER, W., u. A. V. NYARY: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **177**, 60 (1935). — HILDEBRANDT, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **199**, 568 (1942); **204**, 662 (1947). — HOFFMANN, G., u. L. LENDLE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 376 (1951). — HOTOVY, R.: Arzneimittelforsch. **1**, 160 (1951). — KIESE, M., H. GUMMEL u. R. S. GARAN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **184**, 197 (1937). — KINUKAWA, CH.: Tohoku J. exper. Med. **22**, 314 (1933). — LENDLE, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 392 (1933); **180**, 518 (1936); **182**, 72 (1936). — HEFFTERS Handb. d. exper. Pharmacol. Erg. Werk **1** (1935). — MEHNERT, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **184**, 181 (1937). — ÖSTLING, G.: Acta pharmac. tox., K'hvn. **3**, 275 (1947). — ROTHLIN, E.: Helvet. med. acta **1**, 460 (1934). — Proc. of the R. Virchow. Med. Soc. in the City of New York **6**, 74 (1947). — STRAUB, W., E. TRIENDL u. J. BODE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **199**, 427 (1942). — WEESE, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **135**, 228 (1928); **141**, 329 (1929). — Digitalis. Leipzig: Georg Thieme 1936.

Dr. H. GIERTZ, Pharmacol. Inst. d. Med. Akademie Düsseldorf.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. HÄUSLER).

Über den Nachweis von 5-Oxytryptamin (Enteramin, Serotonin) in Carcinoidmetastasen.

Von

F. LEMBECK.

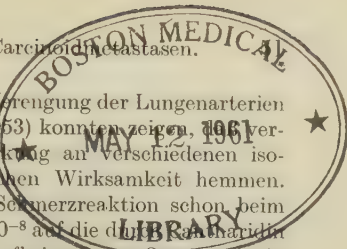
Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. August 1953.)

ERSPAMER (1940) vertrat als erster die Ansicht einer endokrinen Funktion der enterochromaffinen Zellen des Verdauungstraktes. Auf Grund histochemischer Untersuchungen konnte angenommen werden, daß in den Granula dieser Zellen ein Di- oder Polyphenolderivat vorhanden sein müsse (LISON 1931, CLARA 1933, VIALLI u. ERSPAMER 1933). Spätere Untersuchungen (ERSPAMER¹⁻⁵) führten zur Beschreibung einer Substanz, die besonders in der an chromaffinen Zellen reichen Mucosa des Magenfundus des Kaninchens vorkommt und von ERSPAMER *Enteramin* benannt wurde. ERSPAMER¹⁻³ führte die Enteraminwirksamkeit auf die erwähnte histochemisch in Erscheinung tretende Substanz zurück und grenzte die Wirksamkeit gegen die anderer bekannter Substanzen sowie gegen Substanz P ab. Neben verschiedenen chemischen Eigenschaften (pH-Beständigkeit, Oxydierbarkeit, Diazotierbarkeit, Desaminierung, Benzoylierung, Formolbehandlung, UV-Bestrahlung) wurde vor allem die starke Darm- und Uteruswirksamkeit sowie die Senkung des Kaninchenblutdrucks (Urethannarkose) hervorgehoben. Außer in Magenschleimhautextrakten fanden sich in der Milz (ERSPAMER³) vor allem aber in den Speicheldrüsen von *Octopus vulgaris* (533 µg/g) und in der Haut von *Discoglossus pictus* (498 µg/g) (ERSPAMER u. OTTOLENGHI 1953) sowie auch verschiedener anderer Amphibienarten (ERSPAMER⁷) größere Mengen. Die Untersuchungen der letzten Jahre führten zur Identifizierung des Enteramins mit 5-Oxytryptamin (ERSPAMER u. ASERO 1952, ERSPAMER u. BORETTI 1951).

5-Oxytryptamin als Kreatininsulfat wurde von RAPPORT, GREEN u. PAGE¹⁻³ und RAPPORT (1949) als der gefäßverengende Stoff des Blutserums (Spätgift nach FREUND) erkannt, aus dem Serum rein dargestellt und von ihnen *Serotonin* genannt. HAMLIN und FISHER (1951), ERSPAMER und ASERO (1952), SPEETER und M. (1951) gelang die Synthese des 5-Oxytryptamins bzw. seines Kreatininsulfatkomplexes. Die Ansichten über die physiologische Bedeutung der Substanz sind derzeit noch nicht übereinstimmend.

CORELL und Mitarb. (1952) nahmen auf Grund des reichen Vorkommens von Oxytryptamin in Thrombocyten einen Zusammenhang mit der Hämostase an. TAYLOR und Mitarb. (1951) konnten bei Versuchen mit gekreuztem Kreislauf nach zentripetaler Vagusreizung die Abgabe eines Stoffes aus dem Gehirn nachweisen, dessen Eigenschaften ihnen mit Oxytryptamin vereinbar erschienen. REID (1951), REID und RAND (1952), PAGE (1952), FREYBURGER und Mitarb. (1952), MOTT und PAINTAL (1953) sowie HEYMANS und VAN HEUVEL-HEYMANS (1953) untersuchten die Wirkung auf Kreislauf und Atmung. Die Blutdruckwirkung ist je nach Tierart verschieden und besteht beim Hund und bei der Spinalkatze im Gegensatz zum



Kaninchen in einer Steigerung, für die vor allem eine Verengung der Lungenarterien ausschlaggebend zu sein scheint. SINHA und WEST (1953) konnten zeigen, daß verschiedene Lokalanästhetica die Oxytryptaminwirkung an verschiedenen isolierten Organen entsprechend ihrer lokalanästhetischen Wirksamkeit hemmen. ARMSTRONG und Mitarb. (1952) beobachteten eine Schmerzreaktion schon beim Aufbringen von Oxytryptamin in der Konzentration 10^{-8} auf die durch Acetarsäure aufgezogene Haut. UMRATH (1953) hingegen fand ein Aufbringen von Oxytryptamin auf die Hornhaut selbst in Konzentrationen bis 10^{-3} schmerzlos. FELDBERG und TOH (1953) sowie GADDUM (1953) untersuchten die Wirksamkeit des Oxytryptamins an isolierten Darmstücken und fanden eine Desensibilisierung durch vorangegangene hohe Dosen. Erstere Autoren konnten so die Oxytryptaminwirkung von der Wirksamkeit der Substanz P unterscheiden, was in der vorhergegangenen Veröffentlichung von DOUGLAS, FELDBERG, PATON und SCHACHTER (1951) noch nicht geschehen war; sie bestimmten die Wirksamkeit in den einzelnen Darmabschnitten und fanden die höchsten Werte in der Pylorusgegend beim Hund, im Fundus beim Kaninchen. Die Mucosa des Hundedarmes enthielt 4 und $10 \mu\text{g/g}$, die Muscularis externa nur Spuren. Sie wiesen auf den Zusammenhang des Oxytryptamins mit drüsigen Elementen hin. Über ausführliche Untersuchungen des Magen-Darmtraktes verschiedener Tiere berichtete ERSPAMER⁹. BACQ, FISCHER und GHIRETTI (1952) zeigten die Abgabe von Oxytryptamin nach Nervenreizung aus der Speicheldrüse des *Octopus vulgaris*.

ERSPAMER^{6,7} stimmt nicht mit allen dieser Ansichten über die biologische Bedeutung des Oxytryptamins überein (vgl. TAYLOR 1951, CORREL und Mitarb. 1952). Vielmehr sieht er die wesentliche Bedeutung in der Wirkung auf die afferenten Gefäße des Nierenglomerulus, die durch Oxytryptamin verengt werden, wodurch schon kleine Dosen (bei der Ratte $10 \mu\text{g/kg}$) eine antidiuretische Wirkung haben; der Wirkungsmechanismus dürfte allerdings beim Hund anders als bei der Ratte sein (ERSPAMER u. OTTOLENGHI 1953). ERSPAMER⁷ bringt diese Befunde in Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedener Nierenerkrankungen. Im Serum wurden je nach Tierart bis zu $7 \mu\text{g/ml}$ (Katze), in der Milz bis zu $22 \mu\text{g/g}$ (Kaninchen) gefunden (ERSPAMER u. FAUSTINI 1953). Eine Hemmung der Wirkung auf den Carotisstreifen ist möglich durch Sympathicolytica (Yohimbin, Dihydroergotamin, Dibenzamin) (REID 1951, REID u. RAND 1951, ERSPAMER⁸), am Meerschweinchenileum durch Atropin und Antihistamin (RAPPORT u. KOELLE 1953), sowie durch große Dosen Oxytryptamin und Tryptamin (GADDUM 1953, FELDBERG u. TOH 1953).

Etwa als ERSPAMER erstmalig eine endokrine Funktion der enterochromaffinen Zellen annahm, wies FEYRTER (1934, 1938) auf Grund pathologisch-anatomischer Befunde auf die Bedeutung der „diffusen endokrinen epithelialen Zellen“ hin und vertrat die Ansicht einer endokrinen Funktion dieser „Hellen-Zellsysteme“ des Magen-Darmtraktes. Beide Begriffe sind auf morphologische und histochemische Charakteristica aufgebaut. Ursprünglich hielt CIACCIO (1907) alle Gelben Zellen für mutmaßliche Adrenalinbildner. Die Chromaffinität, die diesen Zellen ebenso wie denen des Nebennierenmarkes zu eigen ist, geht nach GERARD, CORDIER und LISON (1930) auf die Oxydation einer in der Zelle vorhandenen Substanz zurück; auch die Argentaffinität dieser Zellen hängt von dieser Substanz ab, die schon CORDIER und LISON (1930) und CLARA und CANAL (1932) als ein ortho-Dioxybenzolderivat aufgefaßt haben. Dieser Ansicht schloß sich FEYRTER an, wies aber darauf hin, daß dies erst nach vorheriger Formolfixierung deutlich zu sehen ist. Ein Zusammenhang der Gelben Zellen mit den Neurofibrillen des vegetativen neuralen Endnetzes wurde von SMARD (1934) beschrieben. FEYRTER (1953) vertritt die Ansicht, „daß die Gelben Zellen zumindest darauf verdächtig sind, daß auch sie im Sinne von intercalären Elementen die Erregung aus dem Endnetz überleiten auf das eigentliche

Erfolgsgewebe (und auch umgekehrt), hier auf die exokrinen und resorbierenden Elemente des Darmepithels“, glaubt aber im Gegensatz zu FRÖHLICH und BÜCHNER nicht, daß sie als neurogene Elemente schlechtweg aufzufassen sind.

Neben morphologischen und histochemischen Befunden, die auf eine Endokrinie der Gelben Zellen hinweisen, umrissen BOHN (1939, 1942) und FEYRTER (1938, 1953) das klinische Bild des *Carcinoids*, dem von den Gelben Zellen ausgehenden Tumor, mit der Bezeichnung „endokrinnervöse Enteropathie“: Subjektive Beschwerden von Seiten des Verdauungstraktes, objektiv feststellbare gesteigerte Darmmotorik, Hypoglykämie, Nachkrankheiten in Form von Cholecystopathien und Leberschädigungen, sowie allgemeine Erscheinungen wie Neurasthenie und Neigung zu allergischen Erkrankungen. Derartige Enteropathieformen wurden bei 85% aller Carcinoidträger beschrieben, allergische Erkrankungen bei über 50% (FREYTER 1953). Die *Appendicite neurogène* nach MASSON (1924) wird als Akme dieser Enteropathie gewertet und auch die *idiopathische Enteritis* nach PORGES (1938) damit in Zusammenhang gebracht. Ob andererseits die von ISLER und HEDINGER (1953) beschriebenen Klappenfehler und Endokardveränderungen bei 2 Carcinoidfällen kausal damit in Zusammenhang gebracht werden dürfen, sei dahingestellt.

Die sowohl von FEYRTER als auch von ERSPAMER aus verschiedenen Gesichtspunkten vertretene Ansicht einer endokrinen Funktion der Gelben oder enterochromaffinen Zellen, veranlaßte FEYRTER schon 1934—1936 pharmakologische Untersuchungen von Carcinoiden anzuregen, was bei der geringen Häufigkeit dieser Tumoren — nach ISLER und HEDINGER (1953) 20 unter 16812 Obduktionen — nur in wenigen Fällen möglich war.

FEYRTER und UNNA (1936) untersuchten Carcinoidextrakte zunächst im Hinblick auf die Ähnlichkeit mit den Zellen der LANGERHANNSSchen Inseln auf Insulin, fanden aber keine Blutzuckersenkung, vielmehr in einem Falle eine angedeutete Blutzuckersteigerung. Blutdruckversuche an der Spinalkatze ergaben nur in einem Falle eine geringe Blutdrucksteigerung. Dies und die chromaffine Natur des Carcinoids veranlaßte sie, Adrenalin oder eine adrenalinähnliche Substanz in den Carcinoiden zu vermuten. SELBERG (1941) untersuchte den Extrakt eines, gleich den von FEYRTER und UNNA (1936), operativ gewonnenen Carcinoids am Kaninchenblutdruck unter Urethannarkose und fand eine Blutdrucksenkung, was zu einem Meinungsaustausch mit BOHN und FEYRTER (1942) führte, wobei das Hauptgewicht auf die Frage der raschen Verarbeitung des untersuchten Materials gelegt worden war. ERSPAMER¹ beschrieb, wie bereits erwähnt, am Kaninchen ebenfalls eine blutdrucksenkende Wirkung des Enteramins. Er widersprach der Erwägung von FEYRTER und UNNA (1936), daß es sich um Adrenalin handeln könne.

Des weiteren galt das Augenmerk einer Beeinflussung der relativen Häufigkeit der Gelben Zellen unter verschiedenen Zuständen und Bedingungen. Bei Urämie wurde beispielsweise eine starke Vermehrung in Fundus und Cardia erwähnt, eine Beeinflussung durch Pharmaca, Vitamine und Hormone schien teilweise möglich, ließ jedoch keine Schlußfolgerungen zu (s. FEYRTER 1953).

Die mit den A-Zellen des Pankreas identischen Zellen des *insulären Gangorgans* beschrieben FERNER, GAEDE und KASTRUP (1950) als die Ursprungsstätten des *Glucagons*, des glykogenolytisch-hyperglykämisierenden Faktors der Bauchspeicheldrüse und wiesen damit ihre endokrine Funktion nach.

Der Plan, Carcinoiden auf „Substanzen“ zu untersuchen, stand schon lange auf dem Arbeitsprogramm unseres Institutes, doch kamen infolge der Seltenheit der Carcinoiden die getroffenen Vorbereitungen erst im Mai

dieses Jahres zur Auswirkung, als ein Fall von Carcinoidmetastasen anfiel*.

Die Untersuchung des Carcinoids (LEMBECK²) sollte einerseits die Frage, ob Adrenalin oder ähnliche Substanzen darin enthalten sind, berühren; vor allem aber bot die Untersuchung die beste Möglichkeit festzustellen, ob Enteramin nach ERSPAMER als das Produkt der enterochromaffinen Zellen anzusehen sei. Gleichzeitig war damit auch das fehlende Bindeglied zwischen den Arbeiten ERSPAMERS und FEYRTERS zu erwarten, ob nämlich Oxytryptamin als Substanz der von FEYRTER vertretenen endokrinen Funktion dieser Zellen anzusehen sei.

Methodik.

Bei der Obduktion einer am 30. 4. 1953 ad exitum gekommenen 65jährigen Frau (Prot. Nr. 613/53 des Path.-anat. Inst. der Univ. Graz, SCHMID 1954), wurden Metastasen eines typischen Dünndarmcarcinoides mit vorwiegendem Basalzellcharakter in Gekröse und Leber gefunden und bis 5. 5. 1953 im Kühlschrank aufgehoben. Nach Überbringung in das pharmakologische Institut wurden sofort etwa 10 g entnommen und mit dem daraus bereiteten Extrakt (T), der auch nach noch 8 Wochen keinen nennenswerten Wirksamkeitsverlust zeigte, zwischen 5. 5. und 25. 5. 1953 Versuche durchgeführt. Das übrige Tumorgewebe blieb eingefroren, bis daraus am 5. 6. 1953 ein weiterer Extrakt (T') bereitet wurde.

Extraktbereitung. Das Gewebe wurde mit Seesand fein zerrieben, dann mit der 5fachen Menge n/50 HCl versetzt, kurz aufgekocht und anschließend auf pH 5 gebracht. Über Nacht fiel ein Niederschlag aus, nach dessen Abfiltrieren eine völlig klare, leicht gelbliche Flüssigkeit übrigblieb, die bei +2° C aufbewahrt wurde und von der jeweils kleine Mengen für die einzelnen Untersuchungen entnommen wurden, die erst vor dem Versuch auf pH 7 gebracht wurden.

Die Untersuchungen am isolierten *Meerschweinchenileum* erfolgten in der üblichen Versuchsanordnung nach BARSOUM und GADDUM (1935), wobei jedoch die Badtemperatur 32° C betrug und der Zusatz von Atropin zur Tyrodelösung jeweils gesondert erwähnt wird.

Rattenuterus und -colon. Die Versuchsanordnung entsprach der von GADDUM, PEART und VOGT (1949) angegebenen unter Verwendung der folgenden Lösung: NaCl 0,9%, KCl 0,042%, CaCl₂ 0,006%, NaHCO₃ 0,05% und Glucose 0,05%.

Das *isolierte Kaninchenileum* wurde im 8 ml-Bad bei 37° C in Tyrode verwendet.

Die *Durchströmung des Kaninchenohres* nach KRAWKOW und PISSEMSKI erfolgte unter Verwendung eines sehr einfachen *Zeitordinatenschreibers* (Abb. 1): Eine MAREYSche Kapsel von 6 cm Durchmesser, bespannt mit einer dicken Gummimembran (Fahrradschlauch), wird über eine Capillare (Thermometerrohr 5—20 cm lang, 0,1 mm Durchmesser) ans Vakuum (Wasserstrahlpumpe) angeschlossen. Im Seitenschluß befindet sich ein Ventil, das über ein Relais (Empfindlichkeit 2 mA bei 24 V) geöffnet werden kann. Die aus dem Ohr ausfließenden Tropfen werden in einer Rinne gesammelt und schließen beim Abtropfen einen Kontakt. Dieser

* Dank gebührt in ganz besonderem Maße Herrn Prof. Dr. M. RATZENHOFFER (Path. anat. Institut der Universität Graz, Vorstand Prof. Dr. TH. KONSCHIEGG), der selbst an einer solchen Zusammenarbeit zwischen dem Path.-anatomischen und dem Pharmakologischen Institut interessiert war und durch dessen besondere Umsicht bei der Gewinnung des Materials die vorliegenden Untersuchungen überhaupt erst möglich wurden (RATZENHOFFER u. LEMBECK 1954, SCHMID 1954).

Stromkreis betätigt dann das Relais, wodurch bei jedem Tropfen das Ventil geöffnet und damit das langsame Leersaugen der MAREYSchen Kapsel unterbrochen wird, wobei der Schreibhebel wiederum in seine Ausgangslage zurückspringt. Dem Abstand zwischen 2 Tropfen entspricht die Membraneinziehung, die zwar nicht linear verläuft, aber durch Kontaktschluß nach der Stoppuhr leicht geeicht werden kann. Durch Auswahl der Gumminembran, des Kapseldurchmessers und des Vakuums ist eine weitgehende Anpassung an jede Schreibgeschwindigkeit möglich.

Spinalkatze und Nickhäute. In einer sterilen Operation 11 Tage vor dem Versuch war ein Ganglion cervicale sup. extirpiert worden. In Äthernarkose wurde nach Abtragen des Dens epistrophei das Rückenmark durchgeschnitten und durch das Hinterhauptsloch das Gehirn zerstört, dann künstliche Atmung und Wärmeregulation angeschlossen und nach 3 Std mit dem Versuch begonnen. Die Kontraktionen

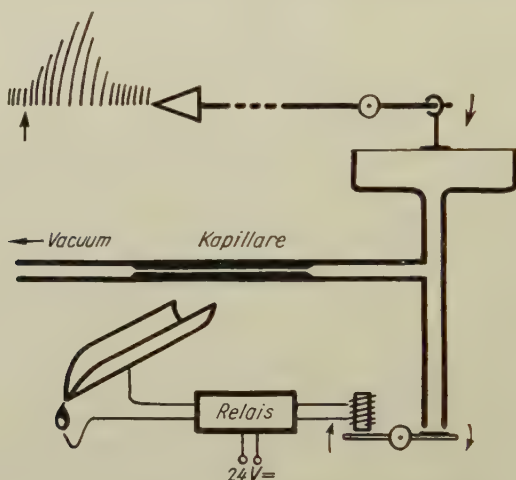


Abb. 1. Zeitordinatenschreiber, Erläuterungen im Text.

der Nickhäute wurden durch einen isotonen Schreibhebel 1:25 vergrößert. Die Blutdruckschreibung erfolgte mittels Quecksilbermanometer von der Carotis aus. Die Injektionen wurden in die Vena femoralis verabreicht, jeweils mit 1 ml Kochsalzlösung nachgespült.

Papierchromatographie. Zu allen Versuchen wurde das Papier Macherey & Nagel Nr. 214 in absteigender Chromatographie verwendet. Als Lösungsmittelgemische dienten n-Butanol gesättigt mit n-HCl sowie Isopropanol: n/10 HCl im Verhältnis 70:30. Zum Besprühen wurden verwendet:

1. PAULYS Reagens (10 Teile 0,2% iger Sulfanilsäure in 0,05 n HCl und 1 Teil 1% ige Natriumnitritlösung) nach vorherigem Besprühen mit 5% iger Natriumbicarbonatlösung (ERSPAMER u. BORETTI 1951).

2. Dinitrobenzoesäure, wobei ein Gemisch aus 3 Teilen Butanol, 2 Teilen 5% iger alkoholischer Lösung von Dinitrobenzoesäure und 1 Teil 5% ige NaOH-Lösung verwendet wurde (RAPPORT 1949).

Die Aufbringung der Lösungen erfolgte auf 7 cm breite und etwa 40 cm lange Streifen in Form einer über die ganze Breite des Streifen gehenden Linie. Die Laufzeit betrug 12—18 Std bei einer Wanderungsgeschwindigkeit der Lösungsmittelfront von etwa 2 cm/Std. Die Elution der einzelnen Fraktionen des Chromato-

gramms zur Testung am Meerschweinchenileum erfolgte nach der Methodik von LEMBECK¹.

Colorimetrische Untersuchungen erfolgten mit der von ERSPAMER² verwendeten Diazoreaktion nach GEBAUER und FULNEGG durch Kupplung mit Nitroanilin: Zu 3 ml Extrakt- bzw. Oxytryptaminverdünnungen bzw. Wasser als Leerwert wurden 0,6 ml einer 1%igen Natriumbikarbonatlösung zugesetzt. Nach 30 min Stehenlassen im Kühlschrank wurden 0,4 ml des ebenfalls eiskühlten Reagens (gesättigte wäßrige Lösung von p-Nitroanilin unter Zusatz von 0,26 ml konzent. Salzsäure pro 100 ml und nach Abkühlen auf 0° C von 10,0 ml 0,69% iger Natriumnitritlösung) zugegeben. Nach 30 min wurden zu den Gemischen, die sich bei Anwesenheit von Oxytryptamin weinrot färbten, je 10 ml Amylalkohol hinzugefügt und nach wiederholtem Schütteln abzentrifugiert. Die Amylalkoholschicht, in welche der gebildete rote Azofarbstoff quantitativ übergeht, wurde mit dem Weka-Photozellencolorimeter unter Verwendung des Grünfilters colorimetriert.

Alle Zahlenangaben bei den Versuchen an Rattenuterus und -colon, Meerschweinchen- und Kaninchenileum verstehen sich pro ml Bad. Die angegebenen Mengen Tumorextrakte (T, T') sind jeweils auf die entsprechende Menge feuchten Tumorgewebes bezogen.

Für die wertvolle Überlassung von Substanzen sind wir zu Dank verpflichtet: der UPJOHN COMPANY, Kalamazoo, für *Serotonin* (Oxytryptamin-Kreatininsulfat), Herrn Prof. U. S. v. EULER, Stockholm, für *Substanz P* (ein Präparat mit 4 Einh./mg) und der Fa. LA SPEZIA, Paris, für *Neoantergan* (N- α -Pyridil-p-Methoxybenzyl-N'-Dimethyl-Äthylendiamin).

Ergebnisse.

A.

Meerschweinchenileum, Rattenuterus, Froschrectus.

Bei der ersten Untersuchung des Extraktes am Meerschweinchenileum fiel sofort die ungewöhnlich hohe Wirksamkeit auf: Schon 1—2 mg T entsprechende Extraktmengen führten zu einer deutlichen Kontraktion des Darmes.

Die Kontraktionen wurden durch Neoantergan (0,25 μ g) nicht beeinflußt, während eine der Wirksamkeit von 2 mg T entsprechende Histaminkontraktion (0,5 μ g) gleichzeitig völlig unterbunden wurde.

Die Wirkung von 2 mg T entsprach am Meerschweinchenileum etwa 0,025 μ g Acetylcholin (ACh). Nach 0,25 μ g Atropin war die ACh-Kontraktion nicht mehr auslösbar und die von T auf etwa ein Drittel verkleinert. Schon dies ließ neben ACh an Oxytryptamin (OTr) denken, dessen Wirkung schon durch Anwesenheit von Atropin in der halben Konzentration von OTr auf fast ein Zehntel verringert werden kann (RAPPORT und KOELLE 1953). Daher wurde der Extrakt am Froschrectus mit ACh verglichen, wobei sich ein Gehalt von $< 1 \mu$ g ACh/g T ergab. Die am Meerschweinchendarm zugesetzten 2 mg T hätten somit nur 2 μ g ACh aufweisen können, eine Menge, die jedoch nicht mehr in Erscheinung getreten wäre. Somit konnte ACh nicht die Ursache der am Meerschweinchen beobachteten Darmwirkung sein. Dies sei besonders in Hinblick auf SELBERGS (1941) Untersuchungen erwähnt.

Demnach mußte die Darmwirksamkeit auf OTr, Substanz P (PERNOW 1953, LEMBECK¹) oder noch andere unbekannte Stoffe zurückgehen. Beim Vergleich mit OTr ergaben sich am Meerschweinchenileum meist Äquivalente von 10—15 mg OTr/g T, die jedoch besonders an wenig tryptaminempfindlichen Darmstücken noch höher lagen. Daher wurde zunächst eine Untersuchung am Rattenuterus angeschlossen, der besonders OTr-empfindlich ist (ERSPAMER²) und allein durch die angewandten hohen Verdünnungen andere Substanzen weitgehend auszuschließen erlaubte. Beim Vergleich mit OTr an diesem gegenüber dem

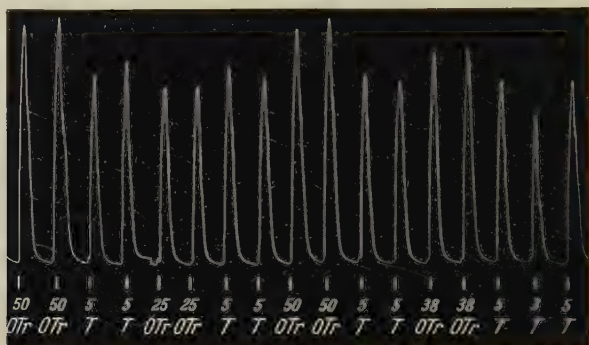


Abb. 2. Rattenuterus. OTr in m μ g, T in μ g.

Meerschweinchenileum bis zu 100mal empfindlicheren Organ zeigten schon 5 μ g T eine Wirkung. 1 g Tumor entsprach 5—7,5 mg OTr (Abb. 2).

Wirkung großer Dosen OTr, T und Substanz P auf die Kontraktionen des Meerschweinchenileums.

1. Nach Zusatz von 5 mg T waren die vorher durch 1 μ g OTr bzw. 100 μ g T auslösbaren Kontraktionen unterbunden.

2. Von den etwa gleich hohen Kontraktionen von 60 μ g T, 3 μ g OTr und 0,1 Einh. Substanz P waren nach Verabreichung von 1,5 mg OTr nur mehr die durch T und Substanz P möglich, während OTr keine Kontraktion hervorrief. Dies konnte besonders an verhältnismäßig wenig OTr-empfindlichen Darmstücken gut gezeigt werden (Abb. 3). Ferner war nach Hemmung gleich hoher Kontraktionen von OTr und T durch eine große Dosis OTr die Rückkehr der niemals ganz unterdrückbaren T-Kontraktionen etwas rascher als die von OTr (Abb. 4). Da diese Ergebnisse immerhin eine Beimengung von Substanz P als möglich erscheinen ließen, wurde

3. die Wirkung großer Dosen Substanz P untersucht. Nach Zusatz von 1 Einh. Substanz P war wohl die Wirkung von 0,2 Einh. Substanz P um etwa die Hälfte verringert, die Wirkung von T aber unverändert. Die

einander ungefähr entsprechenden Mengen von 1 mg T, 5 μ g OTr und 0,25 Einh. Substanz P waren nach Zugabe von 16 Einh. Substanz P wohl alle etwas weniger wirksam; doch war die Wirksamkeitsabnahme bei

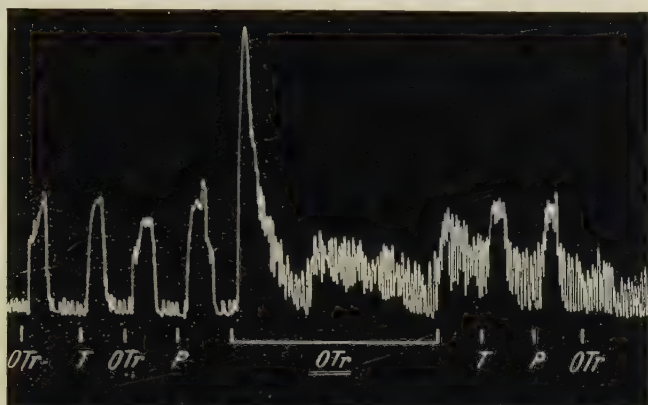


Abb. 3. Meerschweinchenileum. OTr = 3 μ g, OTr = 1500 μ g, T = 60 μ g, P = 0,1 Einh. Substanz P.

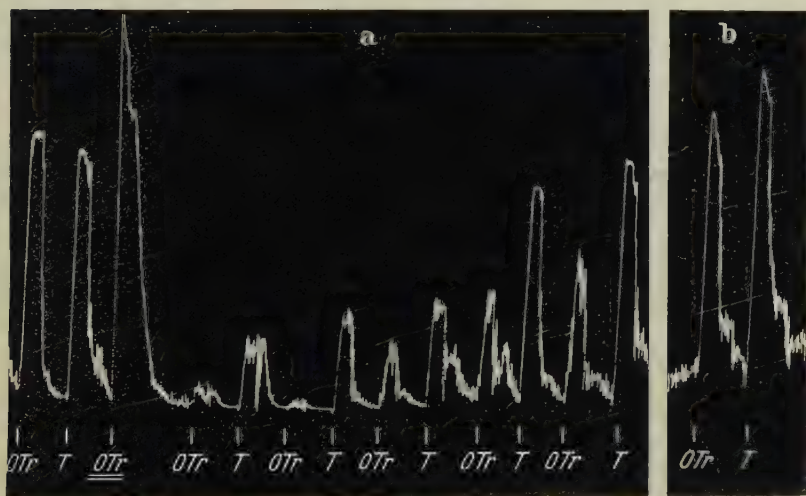


Abb. 4. Meerschweinchenileum. OTr = 1 μ g, OTr = 100 μ g, T = 0,3 mg. Zwischen a und b 12 min Pause.

Substanz P wesentlich größer als bei OTr und T. Wäre Substanz P neben OTr im T, hätte die Hemmung von T zumindestens etwas größer als die von OTr sein müssen, was aber durchaus nicht der Fall war.

Atropinisierung des Meerschweinchenileums.

Durch Zusatz von Atropin wurden gleich große Kontraktionen von OTr, T und Substanz P in verschiedenem Maß gehemmt. Durch 5 m μ g Atropin erfolgte bereits eine starke Hemmung von OTr, während T und Substanz P nicht beeinflußt wurden. Durch 50 m μ g Atropin wurde OTr fast völlig, T etwas und Substanz P überhaupt nicht gehemmt.

Vergleich von T' mit OTr und Substanz P am Meerschweinchenileum, Kaninchenileum, Rattenuterus und Rattencolon.

Zur weiteren Klärung der Frage einer eventuellen Beimengung von Substanz P wurde später die folgende qualitative pharmakologische Prüfung an zwei sowohl für OTr als auch für Substanz P empfindlichen (Meerschweinchen-, Kaninchenileum) sowie zwei sehr OTr- aber nur wenig Substanz P-empfindlichen Organen (Rattenuterus und -colon) angeschlossen. T' ergab bei allen Vergleichen mit OTr nur etwa $\frac{1}{5}$ der Wirksamkeit des ersten, zu allen übrigen Versuchen verwendeten Extraktes T. Die Äquivalente für OTr und Substanz P sind aus Tab. 1 ersichtlich:

Tabelle 1.

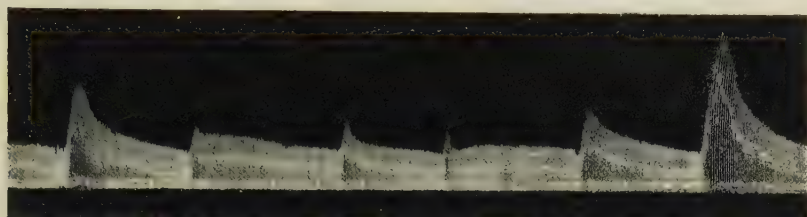
Testobjekt	Wirksamkeits- relation in Einh. Subst. P/ μ g Oxytrypta- min	Äquivalent für mg OTr pro g T	Äquivalent für Einh. Subst. P pro g Tumor
Meerschweinchenileum	0,3	0,5	160
Kaninchenileum	0,3	0,5	160
Rattenuterus	20	0,5	10 000
Rattencolon	15	0,4	6 500

Daraus ergab sich eine ziemliche Übereinstimmung der OTr-Äquivalente, während das Vorhandensein von Substanz P eine wesentlich bessere Übereinstimmung der P-Äquivalente hätte ergeben müssen.

Nach diesen Untersuchungen an Darm und Uterus war das Vorhandensein von OTr als gesichert zu betrachten. Doch mußte gleichzeitig die Wirkung eines zweiten darmwirksamen Stoffes, der weder OTr noch Substanz P sein, noch auch auf eine andere bekannte Substanz zurückgehen konnte, im Auge behalten werden.

Da FEYTER und UNNA (1936) das Vorkommen von Adrenalin oder ähnlichen Substanzen im Carcinoid vermuteten, wurde der Tumorextrakt auch am *durchströmten Kaninchenohr* untersucht. Während am frisch nach der Operation verwendeten Kaninchenohr durch 1 μ g OTr und analoge Mengen T eine lang anhaltende Gefäßverengung erzielt werden konnte, hatten 6 Std nach der Abtrennung des Ohres 40 mg T und bis zu

10 μg OTr nur geringe Wirkung. 0,01 μg Adrenalin wirkte bereits stärker gefäßverengend, so daß das Adrenalin-Äquivalent unter 0,25 μg Adrenalin/g T lag (Abb. 5).



0,02 μg Adr 2 μg OTr 0,01 μg Adr 40 mg T 0,02 μg Adr 0,05 μg Adr

Abb. 5. Durchströmtes Kaninchenohr (6 Std nach der Operation). Registrierung mit Zeitordinatenschreiber. Adr(enalin), OTr, T.

Spinalkatze und Nickhäute (innerviert und denerviert).

2 μg Adrenalin führten zu einer deutlichen Blutdrucksteigerung und zu einer starken Kontraktion der denervierten Nickhaut (D). 2 μg Noradrenalin verursachten einen noch höheren Blutdruckanstieg, aber eine geringere Kontraktion der denervierten Nickhaut. 20 μg OTr steigerten

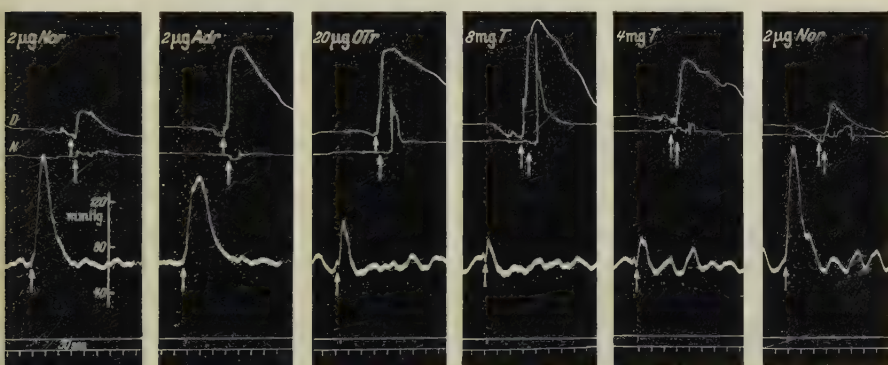


Abb. 6. Spinalkatze. Denervierte (D) und innervierte (N) Nickhaut. Blutdruck. Adr(enalin), Nor(adrenalin), OTr, T.

den Blutdruck nur gering, brachten aber beide Nickhäute zu einer heftigen Kontraktion. Im Vergleich mit 20 μg OTr zeigten 8 mg T eine stärkere, 4 mg T eine schwächere Wirkung auf die innervierte (N) und denervierte (D) Nickhaut, was einem Äquivalent von 2,5—5,0 mg OTr/g T gleichkommt. Die Blutdruckeffekte waren bei den angewandten Dosen von OTr und T nur gering (Abb. 6).

Papierchromatographie.

1. 20 mg T und 10 μg OTr wurden nebeneinander aufgetragen und mit Butanol-Salzsäure chromatographiert. Nach Trocknung erfolgte die

Besprühung mit PAULYS Reagens und Dinitrobenzoesäure-Reagens. In allen Fällen kam es zur völlig gleichartigen Anfärbbarkeit von T und OTr mit R_f -Werten von 0,13—0,17. RAPPORT fand bei der Chromatographie des Oxytryptamin-Kreatininsulfatkomplexes in wassergesättigtem Butanol eine Trennung in Kreatinin (R_f 0,15) und die weniger weit wandernde Indolbase.

2. Bei Verwendung von *Isopropanol* — $n/10$ *HCl* ergaben sich unter sonst gleichen Versuchsbedingungen sowohl für OTr (aufgetragen 0,5 mg) als auch für T (aufgetragen 80 mg) eine Farbreaktion mit PAULYS Reagens zwischen R_f 0,52 und R_f 0,59. Zu weiteren Versuchen wurden nur schmale Kontrollstreifen der Länge nach vom entwickelten Papierchromatogramm abgetrennt und zur Anfärbung benützt. Die übrige

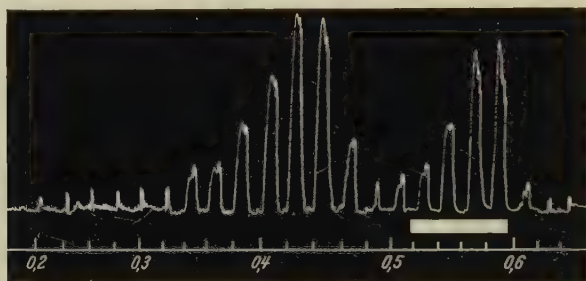


Abb. 7. Meerschweinchenileum. Prüfung der eluierten Fraktionen eines Papierchromatogrammes von 80 mg T. 50 Fraktionen zu je R_f 0,02. Elution mit je 0,5 ml, wovon je 0,05 ml zum 2 ml-Bad zugesetzt wurden. Bereich der Anfärbbarkeit mit PAULYS Reagens.

Streifenbreite wurde quer zur Wanderungsrichtung in schmale Streifen zerschnitten, die eluiert und am Meerschweinchenileum getestet wurden. Im Streifen mit T zeigte sich, besonders deutlich in Chromatogrammen, die auf diese Art in 50 einzelne Fraktionen zerteilt worden waren, neben der der Anfärbbarkeit entsprechenden Darmwirksamkeit, also der OTr-Wirkung zwischen R_f 0,52—0,59, ein deutliches zweites Maximum der Darmwirksamkeit zwischen R_f 0,40—0,46 (Abb. 7). Auch hier schien ein Vergleich mit Substanz P angebracht: Die Wirksamkeit von OTr fand sich wieder zwischen R_f 0,52 und 0,59, die von Substanz P zwischen R_f 0,36 und 0,40. Chromatogramme, die nur in wenige Fraktionen, etwa 10, geteilt worden waren, zeigten hingegen den Unterschied zwischen den R_f -Werten von Substanz P und dem zweiten im Tumor vorkommenden darmwirksamen Stoff nur undeutlich. Ein Vergleich der OTr-wirksamen Fraktionen mit ebenfalls chromatographierten OTr ergab 2,5 mg OTr/g Tumor.

Colorimetrische Bestimmungen.

Vorversuche wurden mittels des PAULYSchen Reagens ausgeführt: Dem zur Anfärbung des Papierchromatogrammes verwendeten Reagens

wurde noch 1 Teil n-NaOH zugesetzt und dies dann, bei 0° C, mit gleicher Menge Tumorextrakt und OTr-Verdünnungen versetzt. Diese Lösung wurde direkt zur Colorimetrie in der angegebenen Weise verwendet. Alle übrigen Versuche wurden nach GEBAUER und FULNEGG durch Kupplung mit p-Nitroanilin und Ausschütteln mit Amylalkohol ausgeführt. Bis zu 100 µg OTr ergaben die Extinktionswerte eine Gerade. Im Vergleich mit dieser Eichgeraden ergab sich bei Verwendung des zuerst untersuchten Extraktes T ein Wert von 2,8 mg OTr/g Tumor. Der später gemachte Extrakt (T') ergab jedoch nur 1,8 mg OTr/g Tumor. Diese Abnahme auf 68% des ersten Extraktes steht in Widerspruch mit der Abnahme auf etwa 20% bei der Testung am Darm. Es ist daraus zu entnehmen, daß ein Übergang in eine andere, weniger wirksame, aber colorimetrisch nicht zu unterscheidende Verbindung stattfinden mußte. Ähnliche Verhältnisse beobachtete ERSPAMER⁵ und unterschied ein aktives und ein inaktives Enteramin. Doch muß bei den vorliegenden Versuchen auch an die Möglichkeit einer stärkeren Abnahme der zweiten darmwirksamen Substanz gedacht werden.

B.

Vergleichsuntersuchungen eines Dickdarmcarcinomes und angrenzender Dickdarmschleimhaut.

Beide Proben stammten von einem frisch bei der Operation gewonnenen Gewebe (Prot. Nr. 7453/53 des Path. anat. Inst. der Univ. Graz). Am Meerschweinchenileum unter Atropin (5 µg) ergaben sich Vergleichswerte von 15 µg OTr/g Dickdarmschleimhaut und 60 µg OTr/g Carcinom. Eine weitere Untersuchung, ob diese Wirksamkeit tatsächlich auf OTr zurückzuführen sei, wurde nicht unternommen, da nur der Ausschluß größerer, mit dem Carcinoid vergleichbarer Mengen im Rahmen der vorliegenden Untersuchung von Interesse war. Am Rattenuterus hatten beide Extrakte weniger als $\frac{1}{100}$ der Wirksamkeit des Carcinoids.

Besprechung der Ergebnisse.

Das Carcinoid stellt eine „pathologische Anhäufung“ enterochromaffiner (ERSPAMER) oder Gelber Zellen (FEYRTER) dar. Unsere Befunde ergaben:

1. Die Bestätigung der Annahme ERSPAMERS, daß Enteramin tatsächlich den enterochromaffinen Zellen entstammt, sowie die quantitative Bestimmung der Oxytryptaminmenge in diesen Zellen.

2. Eine pharmakologische Stellungnahme zur Thesis von FREYTER über die endokrine Funktion der Gelben Zellen, wobei auf die früheren Untersuchungen von Carcinoidextrakten (FEYRTER und UNNA 1936, SELBERG 1941) Bezug genommen werden konnte.

Für die Anwesenheit von Oxytryptamin sprechen folgende Befunde:

a) Die Wirksamkeit am Darm (Meerschweinchenileum, Kaninchenileum, Rattencolon) nach Ausschluß von Acetylcholin, Histamin, Substanz P.

b) Die besonders hohe Empfindlichkeit von Rattenuterus und Rattencolon.

c) Die Hemmung durch Atropin war wesentlich geringer als bei Acetylcholin, entsprach aber dem Oxytryptamin.

d) Die vergleichende Untersuchung an Meerschweinchen- und Kaninchenileum, sowie Rattenuterus und -colon ergab übereinstimmende Oxytryptaminäquivalente.

e) Ähnlich wie Oxytryptamin wurde auch die Wirkung des Carcinoid-extraktes durch eine große Dosis Oxytryptamin gehemmt.

f) An der Spinalkatze mit einer innervierten und einer denervierten Nickhaut entsprach das Wirkungsbild des Tumorextraktes dem von Oxytryptamin.

g) Die R_f -Werte im Papierchromatogramm waren bei Verwendung von zwei verschiedenen Lösungsmittelgemischen (Butanol-Salzsäure, Isopropanol-Salzsäure) für Serotonin und den Tumorextrakt identisch, was im ersteren Falle durch Anfärbung mittels PAULYS Reagens und Dinitrobenzoesäure, im anderen Falle mittels PAULYS Reagens und durch Testung der eluierten Fraktionen am Darm gezeigt werden konnte.

h) Die colorimetrische Untersuchung des Tumorextraktes mit den Kupplungsreaktionen nach GEBAUER und FULNEGG und nach PAULY ergaben mit den biologischen Prüfungsmethoden vergleichbare Werte.

Die Anwesenheit einer *zweiten* nicht näher bekannten Substanz konnte schon aus der Inkonsistenz einzelner Oxytryptamin-Äquivalente am Meerschweinchenileum geschlossen werden. Die im Vergleich mit Oxytryptamin nach Desensibilisierung durch große Dosen Oxytryptamin schwächere Hemmung des Tumorextraktes war ein weiterer Hinweis darauf. Schließlich konnte im Papierchromatogramm ein zweites Maximum einer mit PAULYS Reagens nicht anfärbbaren, wohl aber deutlich darmwirksamen Substanz nachgewiesen werden. Falls es sich dabei um eine dem Oxytryptamin ähnliche Substanz handelt, müßte zumindest die phenolische OH-Gruppe fehlen.

Die Frage nach der Menge Oxytryptamin pro Gramm Tumorgewebe kann dahingehend beantwortet werden, daß mit sämtlichen Methoden mehr als 2,5 mg Oxytryptamin/g nachgewiesen werden konnte. Die Eluate der dem Oxytryptamin entsprechenden Fraktionen des Papierchromatogrammes enthielten diese Menge von 2,5 mg/g. Durch die Beimengung einer zweiten, noch unbekannten Substanz mußten die übrigen Untersuchungen am Darm und Uterus beeinflußt werden. Die colorimetrische Bestimmung allein (mit dem Ergebnis von 2,8 mg/g) war schon

von ERSPAMER⁵ als nicht ganz spezifisch beschrieben worden. Der zweite Extrakt (T') hatte am Darm etwa 20%, colorimetrisch etwa 65% Wirksamkeit des ersten Extraktes (T). Es sei daran erinnert, daß der Tumor etwa 48 Std nach dem Tod bei der Obduktion gefunden wurde, bis zur ersten Extraktbereitung drei Tage (T), bis zur zweiten Extraktbereitung (T') 34 Tage im Kühlschrank bei -2°C aufbewahrt wurde.

Ausgeschlossen werden konnte Acetylcholin mit $< 1\text{ }\mu\text{g/g}$, Histamin mit $< 10\text{ }\mu\text{g/g}$, Adrenalin mit $< 0,25\text{ }\mu\text{g/g}$, und Substanz P durch den Vergleich an verschiedenen Organen und die unterschiedlichen R_f -Werte. Wenn auch der Ausschluß von Acetylcholin und Adrenalin im Hinblick auf das nicht mehr ganz frische Untersuchungsmaterial betrachtet werden muß, so stand doch die markante Menge an Oxytryptamin so sehr im Vordergrund, daß daneben auch größere Mengen der ausgeschlossenen Substanzen kaum von Bedeutung sein könnten.

Für histochemische Reaktionen ist die etwa dem Adrenalin entsprechende Reduktionskraft des Oxytryptamins von Wichtigkeit, das sogar Gold-, Silber- und Platinsalze zu reduzieren vermag (RAPPORT, GREEN und PAGE³). ERSPAMER² beobachtete eine weiß-grünliche Fluoreszenz der enteraminhaltigen Extrakte. Auch FEYRTER (1953) erwähnt eine gelbliche Fluoreszenz der Gelben-Zellen. ERSPAMER² fand des weiteren eine Inaktivierung des Enteramins durch Formaldehyd und nahm die Bildung einer SCHIFFSchen Base an. FEYRTER (1953) unterstrich mehrmals die Tatsache, daß Argentaffinität und Chromierbarkeit erst nach Formalinfixierung deutlich werden, wie auch schon SCHMIDTS Bezeichnung „Gelbe-Zellen“ (1906) auf die Gelbfärbung nach Fixierung mit ORTHSchem Gemisch, das auch Formalin enthält, zurückgeht. Die Einwirkung des Formaldehyds auf Oxytryptamin kann verschieden sein, was hinsichtlich histochemischer Reaktionen zu beachten ist: Es könnte am Aminostickstoff zu N-Methylolverbindungen und SCHIFFSchen Basen kommen, aber auch ein Eintritt des Formaldehyds in den Kern in Analogie zu Phenolen ist vorstellbar. Bezüglich der Chromierbarkeit, die durch Einwirkung energischer Oxydationsmittel erfolgt, wäre schließlich an das Vorhandensein der stark chromogenen p-Aminophenolgruppe im Oxytryptaminmolekül zu erinnern, um so mehr als bei der Kynureninbildung aus Tryptophan eine Aufspaltung des Indolringes bekannt ist.

Der hohe Gehalt des Carcinoids an Oxytryptamin läßt — unter der Annahme, daß es von den Zellen abgegeben wird — die Frage nach der pathophysiologischen Bedeutung dieser Substanz und dem möglicherweise daraus resultierenden Krankheitsbild erwachsen. Aus den bisherigen experimentellen Untersuchungen über Oxytryptamin geht hervor, daß es ohne offensichtlichen Zusammenhang in recht verschiedenen Zellen und Geweben (Thrombocyten, Gelbe Zellen, Speicheldrüsen des Octopus, Haut von Amphibien) zu finden ist, am ehesten noch ein Zusammenhang mit der Funktion drüsigen Gewebes bestehen dürfte und die Wirkung auf isolierte Organe im allgemeinen viel stärker ist als die auf den Gesamtorganismus. Schließlich muß auch die aus der Eigenhemmung durch große Dosen hervorgehende „Tachyphylaxie“ berücksichtigt werden.

Das Problem der klinischen Oxytryptaminwirkung, von seiten der Carcinoid-Kasuistik wie auch für den vorliegenden Fall, bei dem besonders große Carcinoid-Metastasen vorlagen, ist schwer zu behandeln: Der Tod trat keineswegs durch Zeichen einer chronischen Oxytryptaminvergiftung ein, sondern war auf die mechanische Wirkung des Tumors zurückzuführen (SCHMID 1954). Die Erscheinungen des als *endokrinnervöse Enteropathie* zusammengefaßten Krankheitsbildes und auch das gehäufte Auftreten allergischer Erscheinungen ließen sich mit Oxytryptaminwirkungen vereinbaren, dagegen sind keine Befunde hinsichtlich einer pathologisch-anatomischen Veränderung der Niere in Zusammenhang mit Carcinoiden bekannt.

Auch sind für die Entstehung von Endothel- und Klappenveränderungen (ISLER und HEDINGER 1953) derzeit keine Erklärungen möglich. Eine Blutdruckwirkung ist im Zusammenhang mit Carcinoiden nirgends besonders erwähnt worden. RAPPORT, GREEN und PAGE¹ unternahmen die Untersuchungen, welche zur Isolierung des Oxytryptamins führten, im Hinblick auf eventuelle Vasoconstringentien, die bei Hypertonikern vermehrt im Plasma vorhanden sein oder frei werden könnten. Doch müßte vielleicht auch die Frage der Reaktionsbereitschaft auf Oxytryptamin oder der nach BLASCHKO (1953) durch die Aminooxydase erfolgende Abbau des Oxytryptamins in Betracht gezogen werden. Besondere Bedeutung gewinnen vor allem die Untersuchungen von KONSCHEGG (1932, 1936), der bei Hypertonie einen von Adrenalin zu unterscheidenden Stoff im Serum mit der ZANGFRONINISCHEN Reaktion und auch nach STUBER, RUSSMANN und PROEBSTING vermehrt nachweisen konnte, da auch Oxytryptamin in beiden Fällen eine positive Reaktion gibt. Ferner fand KONSCHEGG (1932), daß Serum 5mal (1,4—10mal) so stark wie Plasma der gleichen Versuchsperson auf isolierte menschliche Gefäßstreifen kontrahierend wirkt. Auch die Oxytryptaminwirksamkeit des Serums ist etwa 5mal so hoch wie die des Plasma, wie aus eigenen, hier nicht näher erwähnten Versuchen hervorging. Bei den 74 von KONSCHEGG (1932) untersuchten Fällen ist — trotz Einschluß einiger besprochenen und erklärter Ausnahmen — die Korrelation zwischen Blutdruckhöhe und der logarithmischen Schwellenkonzentration des Serums am Gefäßstreifen sehr weitgehend: Der Korrelationskoeffizient (nach BRAVAIS) beträgt $-0,71 (\pm 0,06)$, was bei 74 Fällen einem $p < 0,001$ entspricht. Es ist somit wahrscheinlich, daß KONSCHEGG damals das erst seit kurzem bekannte Oxytryptamin erfaßt hat, dessen Zusammenhang mit der Hypertonie dadurch bedeutungsvoll erscheint.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnten, besonders unterstützt durch die unter B. erwähnten Vergleichsuntersuchungen, Beweise für einen, dem Carcinoid spezifischen, hohen Gehalt an Oxytryptamin erbracht und daneben noch eine zweite nicht näher bekannte darmwirksame Substanz nachgewiesen werden. Dies bedeutet einerseits eine Bestätigung der Ansicht ERSPAMERS über die Herkunft des Oxytryptamins, andererseits darf dadurch Oxytryptamin als das Produkt der von FEYRTER angenommenen endokrinen Leistung der Gelben-Zellen angesehen werden. Es ist verfrüht, schon über die physiologische Bedeutung des Oxytryptamins zu diskutieren; immerhin wissen wir einiges über seine Eigenschaften, ähnlich wie dies anfänglich beim Histamin der Fall war,

von dem ebenfalls die einzelnen Wirkungen, Möglichkeiten der Freisetzung sowie sonstige Eigenschaften sehr gut bekannt sind, über dessen physiologische Bedeutung aber immer noch nicht restlose Klarheit herrscht. So steht es jetzt mit dem Oxytryptamin, wobei es durchaus möglich sein kann, daß auch seine Funktion sogar an verschiedenen Stellen des Organismus durchaus verschiedene Bedeutung haben kann.

Zusammenfassung.

Die Untersuchung von Carcinoidmetastasen ergab einen Gehalt von mindestens 2,5 mg/g 5-Oxytryptamin, außerdem konnte ein zweiter darmwirksamer Stoff nachgewiesen werden.

Damit wird die Ansicht ERSPAMERS über die Herkunft des 5-Oxytryptamins aus den enterochromaffinen (Gelben) Zellen des Verdauungstraktes bestätigt und die FEYRTERSche These ihrer endokrinen Bedeutung unterstützt.

Literatur.

- ARMSTRONG, D., R. M. L. DRY, C. A. KEELE and J. W. MARKHAM: *J. of Physiol.* **117**, 70 P (1952). — BACQ, Z. M., P. FISCHER et F. GHIRETTI: *Arch. internat. Physiol.* **60**, 165 (1952). — BARSOUM, G. S., and J. H. GADDUM: *J. of Physiol.* **85**, 1 (1935). — BLASCHKO, H.: *Pharmacol. Rev.* **4**, 415 (1952). — BOHN, H.: *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 52. Tag. (1940). — BOHN, H., u. F. FEYRTER: *Klin. Wschr.* **1942**, 757. — CIACCIO, C.: *Arch. ital. Anat. e Istol. pat.* **6**, 482 (1907). — CLARA, M.: *Ergebn. Anat.* **30**, 240 (1933). — CLARA, M., u. F. CANAL: *Z. Zellforsch.* **15**, 801 (1932). — CORDIER, R., et L. LISON: *Bull. Histol. appl.* **7**, 140 (1930). — CORREL, J. T., L. F. LYTH, J. VANDER POEL and S. LONG: *Amer. J. Physiol.* **169**, 537 (1952). — DOUGLAS, W., W. FELDBERG, W. D. M. PATON and M. SCHACHTER: *J. of Physiol.* **115**, 163 (1951). — ERSPAMER, V.: (1) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **196**, 343 (1940); (2) **196**, 366 (1940); (3) **196**, 391 (1940); (4) **200**, 43 (1942); (5) **200**, 60 (1942). — (6) *Arch. Int. Med.* **90**, 505 (1952). — (7) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **218**, 92 (1953). — (8) *Arch. internat. Pharmacodynamie* **93**, 293 (1953). — (9) *Naturwiss.* **40**, 318 (1953). — ERSPAMER, V., and B. ASERO: *Nature (Lond.)* **169**, 800 (1952). — ERSPAMER, V., et G. BORETTI: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **88**, 296 (1951). — ERSPAMER, V., u. R. FAUSTINI: *Naturwiss.* **40**, 317 (1953). — ERSPAMER, V., u. A. OTTOLENGHI: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **93**, 177 (1953). — FELDBERG, W., and C. C. TOH: *J. of Physiol.* **119**, 352 (1953). — FERNER, H., K. GAEDE u. H. KASTRUP: *Klin. Wschr.* **1950**, 388. — FEYRTER, F.: *Ergebn. d. Allg. Path.* **29**, 305 (1934). — Über diffuse endokrine epitheliale Organe. Leipzig: J. A. Bart 1938. — Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen. Wien-Düsseldorf: Maudrich 1953. — FEYRTER, F., u. K. UNNA: *Virchows Arch.* **298**, 187 (1936). — FREYBURGER, W. A., B. E. GRAHAM, E. E. RAPPORT, P. H. SEAY, W. M. GORIER, O. F. SWOAP and M. J. VAN DER BROOK: *J. of Pharmacol.* **105**, 80 (1952). — FRÖHLICH u. BUCHER: zit. bei FEYRTER 1953. — GADDUM, J. H.: *J. of Physiol.* **119**, 363 (1953). — GADDUM, J. H., W. S. PEART and M. VOGT: *J. of Physiol.* **108**, 467 (1949). — GERARD, P., R. CORDIER u. L. LISON: zit. bei FEYRTER 1953. — HEYMANS, C., et G. VAN HEUVEL-HEYMANS: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **93**, 95 (1953). — HAMLIN, H. E., and F. E. FISCHER: *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 5007 (1951). — ISLER, P., u. CH. HEDINGER: *Schweiz. med. Wschr.* **1953**, 4. — KONSCHIEGG, TH.: *Z. exper. Med.* **81**, 559 (1932). — *Z. klin. Med.* **131**, 99 (1936). — LEMBECK, F.:

(1) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **219**, 197 (1953). — (2) Nature (Lond.) **172**, 910 (1953). — LISON, L.: Archives de Biol. **41**, 343 (1931). — MASSON, P.: Ann. d'Anat. path. **1**, 3 (1924). — MOTT, J. C., and A. S. PAINTAL: Brit. J. Pharmacol. **8**, 238 (1953). — PAGE, I. H.: J. of Pharmacol. **105**, 58 (1952). — PORGES, O.: Darmkrankheiten. Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1938. — PERNOW, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — RAPPORT, M. M.: J. of Biol. Chem. **180**, 961 (1949). — RAPPORT, M. M., A. A. GREEN and I. H. PAGE: (1) J. of Biol. Chem. **174**, 735 (1948); (2) **176**, 1237 (1948); (3) **176**, 1243 (1948). — RAPPORT, M. M., et G. B. KOELLE: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 464 (1953). — RATZENHOFFER, M., u. F. LEMBECK: (im Druck). — REID, G.: Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci. **29**, 101 (1951). — REID, G., and M. RAND: Nature (Lond.) **169**, 801 (1952). — SCHMID, K.: (im Druck). — SELBERG, W.: Klin. Wschr. **1941**, 1271. — SIMARD, L. C.: Proc. Roy. Soc. of Canada, Sec. V, 1933, 99. — SINHA, Y. K., and G. B. WEST: J. of Pharm. **5**, 370 (1953). — SPEETER, M. E., R. V. HEINZELMAN and D. I. WEISBLAT: J. Amer. Chem. Soc. **73**, 5515 (1951). — TAYLOR, R. D., I. H. PAGE and A. C. CORCORAN: Arch. Int. Med. **88**, 1 (1951). — UMRATH, K.: Persönliche Mitteilung (1953). — VIALLI, A., u. V. ERSPAMER: Z. Zellforsch. **19**, 743 (1933).

Dr. F. LEMBECK, Graz/Österreich, Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Köln
(Direktor: Prof. Dr. H. W. KNIPPING).

Beitrag zur Verwertung mehrwertiger Alkohole in der Ernährung*.

Von
H. SCHLÜSSEL.

(Eingegangen am 29. Juni 1953.)

Die Verbesserung und Ausweitung der Ernährungsbasis durch synthetische und biosynthetische Stoffe wird in vielfacher Weise angestrebt. In eigenen Arbeiten haben wir uns bezüglich der Celluloseaufschließung²⁶, der Gewinnung von Formaldehydkondensat²⁷ und der Einzellerbiosynthese durch Hefe^{24, 25, 28} mit diesem Problem befaßt. In dieser Arbeit soll die Möglichkeit geprüft werden, mehrwertige Alkohole in der Ernährung zu verwenden. Diese Aufgabe interessiert besonders, da gerade in den letzten Jahren die großtechnische Synthese dieser Substanzen wie auch ihre Herstellungskapazität stark verbessert wurde.

Bis auf 1, 2, 4-Butantriol, einen dreiwertigen, und Mesoerythrit, einen vierwertigen Alkohol, handelt es sich bei den geprüften Stoffen um zweiwertige Alkohole, die heute im üblichen Sprachgebrauch unter der Bezeichnung Glykole zusammengefaßt werden.

Mit den Glykolen hat man sich wegen einer Reihe von Vergiftungsfällen^{12, 16, 18} besonders aufmerksam beschäftigt, wobei Toxizitätsbestimmungen im Vordergrund standen. Wegen der großen Giftigkeit einiger dieser Substanzen ist die Verwendung der Glykole in Deutschland in Lebensmitteln²¹ wie auch in Arznei- und Schönheitsmitteln²³ verboten. So finden wir zur Zeit ihre Verwendung im wesentlichen auf Lösungsmittel, Schmiermittel, Glycerinersatz, Kühlerfrostschutz, hydraulische Systeme usw. beschränkt. Es ist jedoch allgemein bekannt, daß die Toxizität der mehrwertigen Alkohole große Unterschiede aufweist. Deren Kenntnis erfordert die Prüfung jedes einzelnen Alkohols, da sich sie nicht aus der chemischen Konstitution ableiten läßt. Zwar scheint die Länge der C-Kette wie auch die Stellung der OH-Gruppen zueinander bezüglich des Abbaues der Verbindung im Organismus einige Bedeutung zu haben, jedoch ließ sich bisher keine sichere Regelmäßigkeit erkennen. Hierbei soll auf die Bemerkung von FORST⁶ verwiesen werden, nach der man die Giftwirkung technischer Produkte keinesfalls mit derjenigen der chemischen reinen Substanzen gleichsetzen kann. Die akute Überdosierung einer Reihe von Glykolen führt zu den bekannten Vergiftungserscheinungen mit zentralen Lähmungen und Kreislaufkollaps, während geringere Dosierung chronischer Gaben vorwiegend Leber- und Nierenschäden zur Folge haben. Eine gute Studie der histologisch faßbaren Veränderungen nach Glykolintoxikationen bringt DOERR⁴ in seiner Monographie.

* Wir danken der Stickstoff A. G. Knappsack (Herrn Dir. Dr. RITTER und Herrn Dr. LÖSCH) für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit. 1,3-Butandiol wurde von den Chemischen Werken Hüls, die übrigen Alkohole von den Badischen Anilin- und Sodafabriken (Herrn Dir. Dr. REPPE) in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Gegenüber diesen toxischen Folgen konnten HANZLIK und Mitarbeiter¹⁰ über eine ernährungsmäßige Verwertung von 1,2-Propandiol im Rattenversuch berichten. Auch sind in den letzten Jahren aus dem LOESERSCHEN Kreis^{12, 1, 2, 3, 5, 13, 15} Berichte über die gute Verträglichkeit von 1,3-Butandiol mitgeteilt worden. Über die Stoffwechselerwertung der mehrwertigen Alkohole ist kaum etwas bekannt. Ein Teil wird über unbekannte Zwischenstufen im Stoffwechsel verbrannt, der Rest unverändert zum Teil mit Glukuronsäure gepaart⁵ ausgeschieden. KUTSCHER¹⁷ hat am Menschen Bilanzversuche gleichen Ergebnisses mit Pentaerythrit durchgeführt. HANZLIK und Mitarbeiter¹¹ konnten zeigen, daß 1,2-Propandiol bei Kohlehydratmangel als Glykogenbildner auftreten kann.

Es erschien deshalb lohnenswert, eine Reihe mehrwertiger Alkohole auf ihre Verwertung in der Ernährung zu prüfen. Bei der Auswahl der hier verwendeten Alkohole wurde die praktische industrielle Herstellungsmöglichkeit mitberücksichtigt, über die z. B. die Monographie von REPPÉ²² orientiert. 1,3-Butandiol ist als Zwischenprodukt in der Buna-herstellung bekannt.

Versuchsteil.

Als Versuchstiere dienten junge weibliche Albinoratten, deren Ausgangsgewicht nur wenig um 70 g schwankte. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten, in denen durch entsprechende Anordnung der Futternäpfe ein Vertragen des Futters ausgeschaltet war. Das Futter wurde 2mal wöchentlich durch Zugabe der dem Trockenfutter gewichtsgleichen Wassermenge unter Umrühren und Aufkochen zubereitet. Die Tiere wurden täglich gewogen, die aufgenommene Futtermenge durch tägliche Rückwägung der Futternäpfe ermittelt. Aufnahme von abgekochtem Wasser ad libitum. Das Grundfutter war nach einem Vorschlag von MCCOLLUM, SIMMONDS und PRITZ¹⁹ in folgender Weise zusammengesetzt:

Haferflocken	60,0 g	238,8 Cal.
Glukose	20,3 g	82,012 Cal.
Gelatine	10,0 g	39,25 Cal.
Butterfett	5,0 g	37,5 Cal.
Grundfutter (trocken)	100,0 g	397,562 Cal.

Die Salzmischung enthielt:

NaCl	0,5148 g
CaCl ₂	0,2569 g
K ₂ HPO ₄	0,3113 g
Kal. citric.	0,5562 g
Calc. lactic.	2,878 g

Alle Tiere wurden zunächst über eine Woche bis zum Erreichen eines gleichmäßigen Gewichtsanstieges mit Grundfutter ernährt. Ab dann wurden 5, 10, 20, 30, 40 Calorienprozent des Trockengrundfutters durch kalorisch entsprechende Mengen der zu prüfenden Alkohole ersetzt. Dafür wurden folgende Verbrennungswerte der Alkohole zugrunde gelegt (LANDOLT-BÖRNSTEIN, Physikal. chem. Tab. 2. Erg. Bd. II):

1,3-Butandiol	= 6,542 Cal/g
1,2-Butandiol	= 6,542 Cal/g
1,4-Butendiol	= 6,542 Cal/g
1,2,4-Butantriol	= 5,321 Cal/g
Mesoerythrit	= 4,123 Cal/g
1,6-Hexandiol	= 7,608 Cal/g
2,5-Hexandiol	= 7,608 Cal/g

Ausgetauscht wurde die Glukose, bei größeren Alkoholmengen auch ein Teil der Haferflocken. Zum Vergleich wurden Kontrolltiere weiterhin mit reinem Grundfutter ernährt. Nach 8wöchiger Verfütterung der Alkohole wurden die Tiere im Ätherrausch getötet, Herz, Lungen, Leber, Nieren, Nebennieren, Milz und Pankreas histologisch als Gefrierschnitt, mit Haematoxin-Eosin und mit Haematoxin-Scharlachrotfärbung untersucht.

Versuchsbeschreibung.

In Vorversuchen wurden an 70 junge weibliche Albinoratten die aufgeführten Alkohole in den genannten Konzentrationen verfüttert, wobei je 2 Tiere die gleiche prozentuale Futtermischung erhielten. 5 Grundfuttertiere dienten zur Kontrolle. Die so erhaltenen Ergebnisse nach 1,2-Butandiol, 1,6-Hexandiol und Mesoerythrit wurden bereits von KÖPPEN¹⁴ zusammengefaßt.

Tabelle 1. Überlebensdauer junger weiblicher Albinoratten nach Fütterung verschiedener mehrwertiger Alkohole über 8 Wochen (je 2 Tiere mit gleicher Futtermischung).

Grundfutter +		nach 8 wöchiger Gabe
1,3-Butandiol . . .	5—40%	überleben
Mesoerythrit . . .	5—30% 40%	überleben Exitus nach 2 und 6 Tagen
1,2-Butandiol . . .	5—30% 40%	überleben Exitus nach 11 und 29 Tagen
1,6-Hexandiol . . .	5 u. 10% 20% 30% 40%	überleben Exitus nach 6 und 15 Tagen Exitus nach 3 und 5 Tagen Exitus nach 5 Tagen
2,5-Hexandiol . . .	5% 10% 20% 30% 40%	Exitus nach 7 und 11 Tagen Exitus nach 5 Tagen Exitus nach 4 Tagen Exitus nach 4 Tagen Exitus nach 4 Tagen
1,4-Butandiol . . .	5% 10% 20% 30% 40%	Exitus nach 7 und 10 Tagen Exitus nach 7 und 13 Tagen Exitus nach 6 und 7 Tagen Exitus nach 2 Tagen Exitus nach 2 Tagen
1,2,4-Butantriol . .	5% 10% 20% 30% 40%	Exitus nach 14 und 16 Tagen Exitus nach 12 und 14 Tagen Exitus nach 9 und 14 Tagen Exitus nach 13 und 14 Tagen Exitus nach 8 und 13 Tagen

In der Tab. 1 ist die Überlebenszeit der Tiere vermerkt. Es wird deutlich, daß 1,3-Butandiol die beste Verträglichkeit zeigt, Mesoerythrit und

1,2-Butandiol nur in hoher Konzentration innerhalb der Beobachtungszeit tödlich wirken, während die restlichen Alkohole (abgesehen von 1,6-Hexandiol in niedriger Konzentration) eine solche Toxizität zeigen, daß sie für die vorgesehenen Zwecke nicht in Betracht kommen. Bei allen Alkoholen war die tödlich wirkende Gesamtmenge um so größer, je geringer die Konzentration war. Eine Ausnahme davon macht nur 1,2,4-Butantriol, nach welchem die Tiere unabhängig von der Konzentration nach einer ungefähr gleich langen Einwirkungsdauer starben. Die vor dem Tode beobachtete Gewichtsabnahme, Ermüdung, Reaktionsträgheit, Diarrhoe, flache und schnelle Atmung usw. wie auch die histologischen Bilder brachten gegenüber den schon bekannten Feststellungen bei akuter und chronischer Glykolvergiftung keine bemerkenswerten Besonderheiten. Die Gewichtszunahme der überlebenden Tiere war bei geringer Alkoholkonzentration größer als nach Gabe hochprozentiger Alkohol-futtermischungen. Auffallend war, daß die geringprozentigen Alkoholtiere einen stärkeren Gewichtsanstieg zeigten als die Kontrolltiere.

Zur Sicherung dieser Beobachtungen wurde mit 1,3-Butandiol, Mesoerythrit und 1,2-Butandiol an jeweils 8 Tieren gleicher Futtermischungen eine neue Versuchsreihe durchgeführt, so daß einschließlich 8 Kontrolltieren 128 junge weibliche Albinoratten in Versuch genommen wurden. Die Ausgangsgewichte dieser weiteren Tiere lagen ebenfalls um 70 g. Wartung und Kontrollen erfolgten in der gleichen schon vorher beschriebenen Weise. Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Werte stellen die Durchschnittszahlen der jeweils 8 gleichgefütterten Tiere dar.

In der Tab. 2 wurde unter anderem durch Zusammenfassen der Werte von jeweils zwei Wochen der Gewichtsanstieg dargestellt. Es ergeben sich folgende Grundsätzlichkeiten:

1. Bei den meisten Tierreihen zeigt sich gegenüber den Kontrolltieren durchweg über 6 Wochen eine stärkere Gewichtszunahme.

2. Die Futteraufnahme nach Alkoholfütterung, abgesehen von den hochprozentigen Futtermischungen, ist gegenüber derjenigen nach Grundfutter gesteigert, damit also auch die Calorienaufnahme.

3. Das Verhältnis des Calorienverbrauches pro Gramm Gewichtszunahme ist bei niedrigprozentigen Alkoholtieren günstiger. Dies drückt sich auch bei der berechneten theoretischen Gewichtszunahme, die mit der den Grundfüttertieren gleicher Calorienzufuhr erreicht worden wäre, aus.

4. Die geringste Toxizität der hier geprüften Alkohole hat 1,3-Butandiol. Es folgen die übrigen Alkohole nach der in Tab. 1 gewählten Reihe.

Hingewiesen sei auf die Tierreihe, in deren sogenanntem Mischfutter 20 Calorienprozent durch verschiedene Alkohole und weitere 20% durch Nährhefe, somit 40 Calorienprozent durch synthetische und biosynthetische Stoffe ersetzt waren. Sie zeigte über 4 Wochen das günstigste

Bild der Futteraufnahme und -verwertung, das jedoch dann auf und unter die Werte der Kontrolltiere absank.

1,3-Butandiol, Mesoerythrit und 1,2-Butandiol lassen in geringer Konzentration während 8wöchiger Verfütterung bei Ratten keine Zeichen einer Schädigung erkennen. Die gegenüber den Kontrolltieren größere Gewichtszunahme resultiert aus einer besseren Verwertung des Futters und einer gesteigerten Freßlust. Nach Literaturangaben scheint es festzustehen, daß nur ein Teil der mehrwertigen Alkohole im Körper verwertet werden kann, und der vielfach größere Teil unverändert wieder ausgeschieden wird. Danach müßte bei allen Alkoholtieren gegenüber den Kontrollen eine verminderte Gewichtszunahme eintreten. Wenn also der beobachtete Effekt nicht auf der calorisch üblichen Ausnutzung der mehrwertigen Alkohole beruhen kann, so müssen diese irgend eine Steuerung der Stoffwechselvorgänge bewirken, die zur besseren Ausnutzung des Restfutters führen. Von fast allen Autoren werden den mehrwertigen Alkoholen narkotische Eigenschaften zugeschrieben, die jedoch bei geringer chronischer Dosierung nicht mehr sichtbar in Erscheinung treten. Man darf an dieser Stelle auch auf die GREMELSSchen Untersuchungen hinweisen^{7, 8, 9}, der bei Äthylalkoholgaben zusammen mit Kohlehydraten eine „Substratsteuerung des Stoffwechsels“ mit negativ spezifisch dynamischer Wirkung herausstellte.

Die einzige bisher vorliegende vergleichbare Arbeit von HANZLIK und Mitarbeitern spricht für die Reproduzierbarkeit der hier erhaltenen Ergebnisse. Diese Autoren fanden nach 1,2-Propandiolgaben von 25—50 Gewichtsprozenten der Futtermenge keine Schäden, in der 25%igen Konzentration im paired feeding experiment nach MITCHELL ebenfalls eine größere Gewichtszunahme als bei den Kontrolltieren. Sie vermuteten als deren Ursache einen größeren Caloriengehalt des Alkoholfutters. Die gute Verträglichkeit auch nach Dauergaben des 1,3-Butandiol konnte durch LOESER und Mitarbeiter festgestellt werden.

Als praktische Folgerung des hier beobachteten Effektes ließe sich eine Mastfütterung, eventuell Schweinemast, denken, bei welcher man dem üblichen Futter einen geringen, unter der toxischen Grenze liegenden Prozentsatz mehrwertiger Alkohole zugibt. Von den hier geprüften Alkoholen scheint sich 1,3-Butandiol dafür am besten zu eignen. Eine Beschränkung der mehrwertigen Alkohole auf die Mastfütterung der Haustiere scheint angeraten, wenn auch die Beobachtungen von MEYER und SCHÜRMEYER²⁰ an 3 Rattengenerationen dafür sprechen, daß 1,3-Butandiol keinen schädlichen Einfluß auf die Fortpflanzungsfähigkeit ausübt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind auch für die ärztliche Therapeutik von Interesse, da sie eine Bestätigung der Alkoholwirkung darstellen, die GREMELS an entsprechendem Krankengut mit Äthylalkoholgaben erzielen konnte.

Tabelle 2.

Futter	Trockenfutteraufnahme/Ratte				Calorienaufnahme/Ratte				Calorien- aufnahme in Prozent zum Grund- futter
	Woche				Woche				
	1.+2.	3.+4.	5.+6.	7.+8.	1.+2.	3.+4.	5.+6.	7.+8.	
Grundfutter	487,3 109,3 114,8 122,0 141,2				1937,3 434,5 456,4 485,0 561,4				± 0%
Mischfutter 1,3-Butandiol 10% Mesoerythrit 5% 1,2-Butandiol 5% Hefe (Torula utilis) 20%	578,9 124,6 143,8 151,9 158,6				2508,6 539,9 623,1 658,2 687,3				+29,5%
1,3-Butandiol 5%	585,0 118,8 148,8 156,1 161,3				2349,0 477,0 597,5 626,8 647,7				+21,3%
1,3-Butandiol 10%	525,6 119,2 119,5 141,7 145,2				2131,4 483,4 484,6 574,6 588,8				+10,0%
1,3-Butandiol 20%	502,4 114,6 113,0 127,8 147,0				2077,2 473,8 467,0 528,4 607,8				+ 7,2%
1,3-Butandiol 30%	491,5 114,2 114,5 128,3 134,4				2071,3 481,3 482,5 540,7 566,4				+ 7,0%
1,3-Butandiol 40%	401,0 84,4 81,7 108,2 126,8				1721,8 362,4 350,8 464,6 544,4				—10,0%
Mesoerythrit 5%	551,0 121,7 135,3 144,7 149,3				2190,6 483,8 537,9 575,3 593,6				+13,0%
Mesoerythrit 10%	557,2 124,0 137,3 142,9 153,0				2217,2 493,0 545,9 568,1 608,3				+14,4%
Mesoerythrit 20%	460,6 105,5 102,8 120,1 132,2				1831,2 419,4 408,7 477,5 525,6				— 5,5%
Mesoerythrit 30%	496,0 113,0 117,5 128,5 136,0				1979,8 451,0 469,0 512,9 542,8				+ 2,2%
1,2-Butandiol 5%	480,6 107,0 115,5 133,0 125,1				1929,77 429,6 463,8 534,0 502,3				— 0,4%
1,2-Butandiol 10%	460,2 96,2 104,2 124,5 135,3				1866,2 390,1 422,5 504,9 548,7				— 3,7%
1,2-Butandiol 20%	409,8 83,2 91,1 106,0 129,5				1694,4 344,0 376,7 438,3 535,4				—12,5%
1,2-Butandiol 30%	344,0 79,4 77,6 86,5 100,6				1449,7 334,6 327,0 364,5 423,9				—25,2%
1,2-Butandiol 40%	340,6				1462,4				—24,5%

Tabelle 2.

Gewichtszunahme /Ratte	Verbrauchte Calorien /g Gewichtszunahme	Theoretische Gewichts- zunahme/Ratte Grundfuttergruppe gleicher Calorienzufuhr	Alkohol/ Ratte in 8 Wochen	Tägliche Alkohol- aufnahme /kg Ratte in gr.	Toxi- zität (T = Tod 1 Ratte, B = Blut- aus- scheidung)
Woche	Woche	Woche			
+ 2. 3. + 4. 5. + 6. 7. + 8.	1. + 2. 3. + 4. 5. + 6. 7. + 8.	1. + 2. 3. + 4. 5. + 6. 7. + 8.			
36	53,8	36,0	Ø	Ø	Ø
0,5 8,0 8,5 9,0	41,4 57,1 57,1 62,4	10,5 8,0 8,5 9,0			
51	49,2	39,4			Ø
4,5 15,5 8,0 3,0	22,0 40,2 82,3 229,1	19,7 11,4 5,9 2,4	32,0 1,3-B 16,0 1,2-B 25,0 M-E.	5,98 1,3-B 3,0 1,2-B 4,7 M-E.	
51	46,0	42,1	18,0	3,37	Ø
8,5 14,5 10,5 7,5	25,8 41,2 59,7 86,4	16,9 11,1 8,1 6,5			
44	48,4	40,0	31,7	6,2	Ø
1,5 12,5 11,5 8,5	42,0 38,8 50,0 69,3	10,3 11,8 9,7 8,1			
37	56,1	34,6	60,3	12,2	Ø
2,0 11,5 8,5 5,0	39,5 40,6 62,2 121,6	11,0 11,2 7,8 4,6			
32	64,7	29,9	102,6	21,3	B
1,0 9,5 6,5 5,0	43,7 50,8 83,2 113,3	9,9 9,0 5,8 4,9			
15	114,8	16,9	97,7	22,5	Ø
Ø 2,0 6,0 7,0	∞ 175,4 77,4 77,8	Ø 2,6 6,3 7,2			
51	43,0	45,1	26,5	4,9	Ø
4,5 15,0 12,5 9,0	33,4 35,9 46,0 65,9	13,0 12,7 10,5 8,5			
51	43,4	44,6	53,5	10,0	Ø
8,0 15,0 11,5 6,5	27,4 36,4 49,4 93,6	15,9 12,5 9,8 6,0			
16	114,4	16,9	89,0	20,4	B
4,5 4,0 3,0 4,5	93,2 102,2 159,2 116,8	4,7 4,5 3,0 4,8			
20	99,0	20,6	139,1	31,1	BTT
3,0 3,0 6,0 8,0	150,0 156,0 85,5 67,9	2,9 2,9 5,7 8,3			
43	44,9	43,2	14,8	2,9	Ø
4,5 11,0 9,0 8,5	29,6 42,2 43,9 84,4	14,7 10,8 8,2 9,5			
35	53,3	36,3	27,8	5,7	BBT
7,0 10,0 11,5 6,5	55,7 42,3 43,9 84,4	7,8 10,8 11,1 6,7			
28	60,5	32,0	48,5	10,3	Ø
8,0 10,0 6,0 4,0	43,0 37,7 73,1 133,9	10,2 12,1 6,6 4,2			
7	207,1	9,3	71,9	17,5	TTTB
Ø Ø Ø 7,0	∞ ∞ ∞ 60,6	Ø Ø Ø 9,3			
— 6	Ø	Ø	83,0	22,1	TT

Zusammenfassung.

Bei jungen weiblichen Albinoratten wurden unterschiedliche Calorienprozentage des Grundfutters durch mehrwertige Alkohole ersetzt. Gewichtszunahme und Futteraufnahme wurden über 8 Wochen täglich kontrolliert.

Die Alkoholtiere zeigten bei nicht toxischer Dosierung eine stärkere Gewichtszunahme als die Grundfuttertiere. Dieser Effekt beruht auf einer vermehrten Futteraufnahme und einer besseren Futterausnutzung. Dabei scheint es sich um eine Allgemeinwirkung der Alkohole zu handeln.

Literatur.

- ¹ BORNMAN, G.: Über die hämolytische Wirkung mehrwertiger Alkohole. *Pharmazie* **5**, 423 (1950). — ² BORNMAN, G., R. KOPF, G. MEYER: Über die Darmwirksamkeit 2- und 3wertiger Alkohole. *Z. exper. Med.* **116**, 87 (1950). — ³ BORNMAN, G., A. LOESER, G. MEYER: Über 1,2,4-Butantriol. Ein Beitrag zur Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **210**, 361 (1950). — ⁴ DOERR, W.: Pathologische Anatomie der Glykolvergiftung und des Alloxandabetes. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. 1949. — ⁵ FISCHER, L., R. KOPF, A. LOESER, G. MEYER: Chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung der Glykole unter besonderer Berücksichtigung von 1,3-Butylenglykol. *Z. exper. Med.* **115**, 22 (1949). — ⁶ FORST, A. W.: Die Giftigkeit der Glykole. *Z. Lebensmittel-Unters.* **90**, 288 (1950). — ⁷ GREMELS, H.: Über die tagesperiodischen Rhythmen einiger Körperfunktionen, ihre Ursachen und Nutzenanwendung. *Zbl. Chirurgie* **258**, 184 (1943/44). — ⁸ GREMELS, H.: Über die Grundprinzipien der vegetativ-hormonalen Stoffwechselsteuerung und ihre Hauptregulatoren. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **203**, 225 (1944). — ⁹ GREMELS, H.: Zur Substratsteuerung des Stoffwechsels und ihre therapeutische Anwendung am Menschen. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **205**, 57 (1948). — ¹⁰ HANZLIK, P. J., H. W. NEWMAN, W. VAN WINKLE jr., A. J. LEHMAN, N. K. KENNEDY: Toxicity, fats and excretion of propylenglycol and some other glycols. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, Baltimore **67**, 101 (1939). — ¹¹ HANZLIK, P. J., A. J. LEHMAN, W. VAN WINKLE jr., N. K. KENNEDY: General metabolic and glycogenic actions of propylenglycol and some other glycols. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, Baltimore **67**, 114 (1939). — ¹² HINRICHS, A., R. KOPF, A. LOESER: Zur Toxikologie des 1,4-Butandiol. *Pharmazie* **3**, 110 (1948). — ¹³ KLEINSORG, H., C. G. SCHMIDT, A. LOESER: Über die Änderung fermentativer Vorgänge durch mehrwertige Alkohole. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **211**, 235 (1950). — ¹⁴ KÖPPEN, K.: Ernährungsmäßige Verwertung von 1,2-Butandiol, 1,6-Hexandiol und Meso-Erythrit im Tierversuch. Diss. Köln 1952. — ¹⁵ KOPF, R., A. LOESER, G. MEYER, W. FRANKE: Untersuchungen über die Pharmakologie und Toxikologie mehrwertiger Alkohole (1,3-Butylenglykol). *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **210**, 346 (1950). — ¹⁶ KRAFT, A., J. RAUSCHKE: Beiträge zur pathologischen Anatomie der Glykolvergiftungen. Diss. Heidelberg 1947. — ¹⁷ KUTSCHER, W.: Über das Verhalten des Pentaerythrits im Stoffwechsel. *Z. physiol. Chem.* **283**, 268 (1949). — ¹⁸ LEHMANN, K. B., F. FLURY: Toxikologie und Hygiene der technischen Lösungsmittel. Berlin: Springer 1938. — ¹⁹ MCCOLLUM, E. V., N. SIMMONDS, W. PITZ: Is lysine the limiting amino-acid in the proteins of wheat, maize or oats? *J. of Biol. Chem.* **28**, 483 (1916/17). — ²⁰ MEYER, G., H. SCHÜRMEYER: Über die Wirkung von 1,3-Butylenglykol auf die generativen Vorgänge bei Ratten. *Klin. Wschr.* **1951**, 231. — ²¹ QUADBECK, G.: Äthylenglykol

und verwandte Verbindungen als pharmazeutische Lösungsmittel. Chem. Z. **74**, 91 (1950). — ²² REPPE, W.: Neue Entwicklungen auf dem Gebiete der Chemie des Acetylens und Kohlenoxyds. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949. — ²³ SCHEUNEMANN, B.: Glykolvergiftungen. Pharmazie **2**, 454 (1947). — ²⁴ SCHLÜSSEL, H.: Eignung und mögliche Größenordnung von Trockenhefe auf Holzbasis in der menschlichen Ernährung. Dtsch. med. Wschr. **194**, 648. — ²⁵ SCHLÜSSEL, H.: Verwendung von Trockenhefe und synthetischen Stoffen in der Therapie und in der Ernährung. Ernährung und Verpflegung **1**, 73 (1949). — ²⁶ SCHLÜSSEL, H., J. HAMACHER: Über Celluloseaufschließung im Rahmen der Nahrungsmittelgewinnung. Dtsch. LebensmRdsch. **46**, 265 (1950). — ²⁷ SCHLÜSSEL, H., B. MACHEREY: Kondensation von Formaldehyd zu Zuckern unter dem Einfluß von Tesla-Schwingungen. Z. Lebensmittelunters. **92**, 252 (1951). — ²⁸ SCHLÜSSEL, H.: Die Erweiterung unserer Nahrungsmittelbasis durch Biosynthese der Einzeller. In K. Saller „Gesundes Land — Gesundes Leben“. München: R. Pflaum-Verlag 1953, 208.

Dr. med. HANS SCHLÜSSEL, Med. Univ.-Klinik Köln-Lindenthal.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Basel (Vorsteher: Prof. Dr. H. STAUB).

ATP-Spaltung im denervierten atrophischen Muskel*.

Von

MARIANNE BOGATZKI.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Juni 1953.)

Mit der Entwicklung der Atrophie des Muskels, der denerviert wurde, setzen sehr charakteristische Veränderungen, unter anderem auch an seinen Eiweißkörpern, ein. Die Abnahme des Gesamtproteingehaltes und die veränderte Extrahierbarkeit^{19, 22} gehen einher mit einer der Atrophieentwicklung proportionalen Verminderung der Myosine und einer Zunahme des Myoalbumins^{20, 21} mit dementsprechenden Veränderungen im Elektrophoresediagramm:

Es findet sich (nach Methode TISELIUS-LONGWORTH) eine Abnahme der Komponenten VII—IX (Nomenklatur der DUBUSSON-Schule) und eine relative Zunahme der Komponenten II—V^{12, 13, 21, 30}.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß die bloße Ruhigstellung des Muskels durch Fixierung sowohl wie durch Tenotomie zu ähnlichen, wenn auch weniger ausgedehnten Veränderungen führt, während der dystrophische Muskel diese Merkmale nicht aufweist³⁰ und auch, außer einer Erhöhung der sauren Phosphatase¹⁰, in den bisher untersuchten Fermentsystemen: ATPase, Malonsäure-Dehydrogenase, Cytochrom-Oxydase und Succino-Dehydrogenase, keine Abweichungen vom normalen Muskel erkennen ließ³⁵.

Die Abnahme der Myosine ist vor allem deswegen bemerkenswert, weil die ATPase-Aktivität des Muskels zu einem großen Teil an die Myosinfraktion des Muskels gebunden ist (ENGELHARDT und LJUBIMOWA¹⁵, ENGELHARDT¹⁷, NEEDHAM⁵¹, BAILEY¹, SZENT-GYÖRGYI⁶⁷) und sich damit die Frage nach dem Verhalten der ATPase-Wirksamkeit des denervierten Muskels ergibt.

LEHNARTZ⁴⁴ hat über die zentrale Bedeutung der ATP infolge ihrer Teilnahme an Phosphorylierungsvorgängen, die zur Muskelarbeit in ursächlichem Zusammenhang stehen (LOHMANNsche⁴⁷ und PARNASSche⁵⁴ Reaktion) und zugleich an Reaktionen, die auf die Resynthese des Glykogens und die Muskelerholung gerichtet sind, zusammenfassend berichtet. WEBER und PORTZEHL⁷³ wiesen auf ihre nun als gesichert geltende Funktion als „Verkürzungssubstanz“ des Actomyosins, des kontraktiven Proteins des Muskels (WEBER⁷², SZENT-GYÖRGYI⁶⁸, MOMMAERTS und Mitarb.⁴⁹) und die enzymatische ATP-Spaltung als unmittelbare Energiequelle für den Kontraktionsprozeß hin und haben ihre Beziehungen zur Muskelarbeit eingehend dargelegt. Danach können jedoch noch keine Aussagen gemacht werden über den molekularen Mechanismus der Formänderung des Actomyosins durch ATP und ATP-Spaltung.

* Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Von wesentlicher Bedeutung erscheint vor allem die enge Kopplung der elektrischen Erscheinungen an den Muskelfasergrenzschichten mit dem Kontraktionsprozeß des Muskels; denn die Abnahme des Membranruhepotentials nach Reizung leitet nicht nur die „Erregungswelle“ und den anschließenden Überleitungsprozeß zu den einzelnen kontraktile Fibrillen ein (s. auch SCHAEFER⁵⁷, ROTHSCUH⁵⁵), sondern führt vielleicht auch zu einer elektrophoretischen Wanderung der Mg^{++} aus den Querbanden^{34, 15, 31} in die A-Abschnitte des Muskels, um dort die ATP-Spaltung einzuleiten und mit Restitution der Membranspannung wieder an die ursprüngliche Stelle zu wandern. Da die ATP-Spaltung zu physiko-chemischen Veränderungen des kontraktile Proteins und zu anschließender Kontraktion führt, würde diese Vorstellung der Mg^{++} -Wanderung infolge veränderter elektrischer Eigenschaften der Fasermembran nach WEBER und PORTZEHL die enge Kopplung der Dauer und Intensität von Membrandepolarisation und Fibrillenkontraktion (BARER⁴, FLECKENSTEIN u. Mitarb.²⁴⁻²⁶) erklären. Die räumliche Anordnung der Mg^{++} in den Querbanden, die des Myosins und der ATP in den A-Abschnitten des Muskels¹³ würde es weiter verständlich erscheinen lassen, daß der Muskel normalerweise trotz seines ATP-Gehaltes ATP nicht merklich spaltet und in Ruhe ist.

Anhaltspunkte für eine direkte Beziehung der enzymatischen, zeitlich mit den letzten Phasen des Aktionsstromes bzw. des QRS-Komplexes im Elektrokardiogramm (s. SCHAEFER⁵⁸) zusammenfallenden ATP-Spaltung zu Prozessen, die zur Restitution der Fasergrenzschichten nach Erregung führen, scheinen insofern gegeben, als man annehmen muß, daß die Aufrechterhaltung bzw. Restitution der Membranstruktur mit ihren charakteristischen Eigenschaften hinsichtlich Erregbarkeit und Permeabilität an energieliefernde Prozesse des Kohlenhydratstoffwechsels geknüpft ist (FURASAWA²⁷, SHANES⁶⁰, STÄMPFLI⁶⁴, s. auch SCHAEFER⁵⁸). Für den glatten Ablauf der Glykolyse jedoch ist ein ganz bestimmtes Gleichgewicht zwischen ATPase und phosphorylierenden Vorgängen notwendig⁷⁴. Ein Hinweis dafür, daß der ATP eine entscheidende Funktion in Fermentsystemen, die an der Aufrechterhaltung der Membranstruktur wesentlich beteiligt sein dürften, zukommt, geht aus ihrer Funktion als Phosphatdonator, z. B. in der Acetylcholin-synthese (NACHMANSON u. Mitarb.⁴⁹, WITTENBERG u. KORNBERG⁷⁵), im Acetylcholin-Cholinesterasesystem hervor.

Die Veränderungen an den Eiweißkörpern des denervierten Muskels zusammen mit dem bekannten veränderten elektrischen Verhalten hinsichtlich Erregbarkeit (siehe TOWER⁶⁹) wie auch der herabgesetzten Membranruheladung⁷ lassen nach den obigen Überlegungen eine Untersuchung der ATP-Spaltung im denervierten Muskel begründet erscheinen.

Für die enzymatische ATP-Spaltung werden im Muskel die in vitro Ca^{++} -aktivierte ATPase des Myosins¹ sowie das von LOHMANN⁴⁶ erstmalig beschriebene und von KIELLEY und MEYERHOF³⁸⁻⁴⁰ isolierte Mg^{++} -aktivierte Ferment verantwortlich gemacht. Um sich daher eine Vorstellung vom Verhalten dieser Fermente machen zu können, wird es entsprechend dem spezifischen Verhalten dieser beiden Enzyme erforderlich sein, die ATPase-Wirksamkeit unter dem Einfluß von Ca^{++} wie auch von Mg^{++} zu untersuchen. Die große Instabilität des Mg -aktivierten Enzyms machte es notwendig, die Untersuchung sofort nach Entnahme des Muskels anzuschließen. Die Versuche wurden daher im Homogenat durchgeführt und auf eine Isolierung der Fermente wurde verzichtet.

Schließlich erschien es wesentlich, nicht nur die ATP-Spaltung zum Proteingehalt des Muskels in Beziehung zu setzen, sondern außerdem den interfibrillären — normalerweise rund 14,5% betragenden³³ — Raum zu berücksichtigen, da dieser Raum mit Entwicklung der Atrophie eine Vergrößerung erfährt³² und Anlaß zu Fehlschlüssen geben kann. Neben der Bestimmung des Proteingehaltes wurde daher der Chlorgehalt des denervierten Muskels untersucht und mit dem des normalen Muskels verglichen. Da Cl auch im denervierten Muskel nur im extrafibrillären Raum vorhanden ist⁶⁹, dürfen aus dem Vergleich des Chlorgehaltes im denervierten Muskel mit dem des normalen Rückschlüsse auf die Größe seines interfibrillären Raumes gemacht werden.

Methodik.

Wie in früheren Versuchen wurde bei ausgewachsenen männlichen Albino-ratten (Gewicht: 200—250 g) der re. N. ischiadicus reseziert. Die operierten Tiere wurden nach 30—40 Tagen dekapitiert und entblutet. Zu diesem Zeitpunkt findet sich das histologische Bild der reinen Atrophie^{8, 32}.

Aus der sofort aus dem atrophischen M. gastrocnemius und dem als Kontrolle dienenden normalen Muskel der kontralateralen Seite entnommenen Muskulatur wurden 200—300 mg in eisgekühltem glasdestilliertem Wasser im Pyrexglas-Homogenisator 3 min homogenisiert. Im 1%igen Homogenat wurde die ATP-Spaltung zur Ermittlung ihres p_H -Optimums bzw. des optimalen Erdalkalimilieus unter wechselnden Bedingungen hinsichtlich p_H (0,05 m K-diäthylbarbitursäure-Puffer durch Zusatz geringer Mengen 0,1 m HCl bzw. KOH bei Messung des p_H mittels Glaselektroden auf die jeweilige p_H titriert) und Erdalkali-Ionenzusatz (Mg^{++} bzw. Ca^{++}) geprüft und schließlich in je 15 Versuchen die ATP-Spaltung bei dem in den meisten Versuchen optimalen p_H 7,4 bestimmt: a) ohne Zusatz von Erdalkali-Ionen, b) bei einer Ca^{++} -Molarität 3×10^{-3} und c) bei einer Mg^{++} -Molarität 3×10^{-3} . Der p_H des Homogenates betrug 7,33, war also nahezu physiologisch.

Das Substrat (Na-ATP Henning)*, mit 0,1 m KOH auf p_H 7,3 titriert, kam in einer Lösung zur Anwendung, die 600—700 γ P/cm³ enthielt. In Anlehnung an die Angaben von DUBOIS und POTTER¹⁶ wurden die Ansätze 15 min bei 37° C exponiert, die Reaktion dann durch Zusatz von 0,5 cm³ 10%iger Trichloressigsäure abgebrochen.

Ein typischer Versuchsansatz war folgender: 0,3 cm³ Pufferlösung, + 0,3 cm³ ATP-Lösung, + 0,04 cm³ 0,1 m $CaCl_2$ bzw. $MgCl_2$, + 0,1 bzw. 0,2 cm³ Homogenat, Aqua dest. ad 1,4 cm³. Die Homogenatmenge wurde so gewählt, daß sich die ATP-Spaltung als eine lineare Funktion der Homogenatmenge erwies. Nach Zusatz der Trichloressigsäure wurden die Ansätze 3 min in Eiswasser inkubiert, anschließend bei 3000 Touren/min zentrifugiert und in aliquoten Mengen der überstehenden klaren Flüssigkeit das anorganische Phosphat nach FISKE und SUBBAROW²³ als Molybdänblau bestimmt. Ablesung mit BECKMAN-Spektralphotometer. Der Faktor wurde durch Mitlaufenlassen einer Standardlösung jeweils neu ermittelt.

Die ATP-Spaltung wurde aus dem Zuwachs an anorganischem Phosphat errechnet und entsprechend den Angaben von DUBOIS und POTTER in γ P/mg Frischgewicht des Muskels und außerdem in γ P/mg Protein ausgedrückt. Dabei wurde der Fehler durch den Gehalt des Homogenates an anorganischem Phosphat vernachlässigt, da er weniger als 1 γ betrug. Der Fehler dagegen, der u. a. durch Selbst-

* Die Na-ATP wurde freundlicherweise von der Fa. Henning, Berlin, zur Verfügung gestellt.

zerfall der ATP im Laufe des Versuches entstand, wurde in der Weise berücksichtigt, daß jeweils ein Ansatz mit Substrat aber ohne Homogenat gemacht wurde. Das nachweisbare anorganische Phosphat wurde dann entsprechend bei den eigentlichen Versuchsansätzen in Abzug gebracht.

Der Proteingehalt des Muskels ergab sich aus der Differenz Gesamt-N minus Rest-N und übliche Multiplikation mit dem empirischen Faktor 6,25. Die Stickstoffbestimmung erfolgte mit Mikro-KJELDAHL.

Die Ermittlung des Gehaltes an Trockensubstanz wurde durch Trocknung bei 110° C bis zur Gewichtskonstanz, die Cl-Bestimmung mit der Mercurinitratmethode in der Modifikation von LANG⁴³ durchgeführt, Berechnung des Chlorgehaltes erfolgte für Frisch- und Trockensubstanz.

Bei der statistischen Berechnung wurden für die „mittlere Abweichung der Einzelbeobachtung vom Mittelwert“ und der „mittleren Abweichung des Mittelwertes“ die Formeln nach BURN⁹, für die Prüfung des Unterschiedes der Durchschnittswerte von Versuchs- und Kontrollmuskeln unter Benutzung der t-Verteilung die Formeln von LINDER⁴⁵ zugrunde gelegt.

Ergebnisse.

Die vergleichende Untersuchung der ATP-Spaltung im Homogenat des denervierten Muskels mit dem des normalen ergab im Bereich p_H 7,0 bis 9,0 ein prinzipiell gleichartiges Verhalten der beiden Muskeln. In den Versuchsansätzen ohne Erdalkalizusatz lag der optimale p_H -Bereich für die ATP-Spaltung für beide Muskeln zwischen p_H 7,4—7,8 bei einem

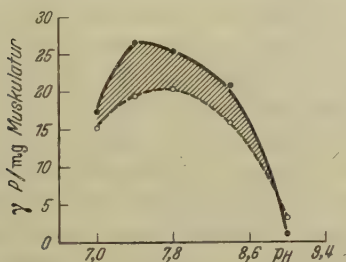


Abb. 1.

Abb. 1. ATP-Spaltung im Homogenat des normalen (•—•) und des denervierten (o---o) M. gastrocnemius der Ratte im p_H -Bereich 7,0—9,0.

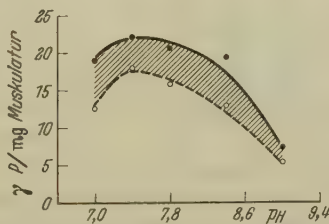


Abb. 2.

Abb. 2. ATP-Spaltung im Homogenat des normalen (•—•) und des denervierten (o---o) M. gastrocnemius der Ratte im p_H -Bereich 7,0—9,0 bei Ca^{++} -Molarität $3 \cdot 10^{-3}$.

wenig ausgeprägten Maximum der ATP-Spaltung bei p_H 7,4 im Homogenat des normalen und p_H 7,8 des denervierten Muskels. In Abb. 1 wird die ATP-Spaltung im Bereich p_H 7,0—9,0 für beide Muskeln kurvenmäßig dargestellt. Jeder Punkt der Kurve entspricht dem Mittelwert aus mindestens 5 Doppelbestimmungen der ATP-Spaltung bei dem jeweiligen p_H .

Aus dem Vergleich der beiden Kurven geht bereits hervor, daß die absolute ATP-Spaltung, bezogen auf das Frischgewicht des Muskels, im Bereich p_H 7,0—8,8 im Homogenat des denervierten Muskels gegenüber dem des normalen Muskels herabgesetzt zu sein scheint.

Wurden den Versuchsansätzen Ca-Ionen in einer Molarität 3×10^{-3} zugesetzt, so war das Verhalten beider Muskeln prinzipiell analog den Versuchen ohne Erdalkali-Ionen-Zusatz. Wie Abb. 2 zeigt, fand sich in den Homogenaten beider Muskeln ein sehr wenig ausgeprägtes Maximum der ATP-Spaltung bei einem p_H 7,4 bei einem auffallend flachen Verlauf der Aktivitätskurven. Im gesamten untersuchten p_H -Bereich lag auch in diesen Versuchen die ATP-Spaltung unter der des normalen Muskels.

Dagegen fand sich ein ausgeprägteres Maximum der enzymatischen ATP-Spaltung in den Homogenaten beider Muskeln im Bereich p_H 7,4 bis 7,8 wenn den Versuchsansätzen Mg-Ionen in einer Molarität 3×10^{-3} zugefügt wurden. Im stärker alkalischen Bereich kam es dabei zu einem steilen Abfall der ATP-Spaltung (siehe Abb. 3). Normaler und denervierter Muskel verhielten sich auch hier analog.

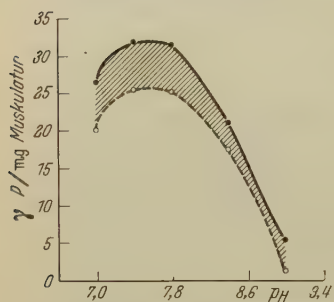


Abb. 3. ATP-Spaltung im Homogenat des normalen (• • •) und des denervierten (o - - o) M. gastrocnemius der Ratte im p_H -Bereich 7,0–9,0 bei Mg^{++} -Molarität $3 \cdot 10^{-3}$.

Wie in den Ansätzen, denen Ca^{++} in gleicher Molarität zugefügt wurde, und den Versuchen ohne Zusatz von Erdalkali-Ionen im Bereich p_H 7,0–8,8 war auch unter Mg -Ionenzusatz die absolute ATP-Spaltung im denervierten Muskel im Vergleich zum normalen herabgesetzt. Vergleicht man schließlich den Einfluß der zugefügten Erdalkali-Ionen auf den Umfang der ATP-Spaltung, so tritt eine deutliche Hemmung durch Ca^{++} und eine erhebliche Aktivierung durch Mg^{++} in Erscheinung.

Es ergab sich daraus die Notwendigkeit einer näheren Untersuchung der ATP-Spaltung unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen dieser Ionen, deren Ergebnis in den Abb. 4 und 5 wiedergegeben ist. In Abb. 4 wird der Einfluß steigender Ca^{++} -Konzentrationen (5×10^{-4} – 6×10^{-3}) dargestellt.

Es war auffallend, daß der hemmende Einfluß der Ca^{++} mit steigender Konzentration größer wurde, im denervierten Muskel jedoch bei den niederen Konzentrationen weniger deutlich als im normalen Muskel.

So betrug z. B. die Hemmung der ATP-Spaltung im normalen Muskel bei einer Ca^{++} -Molarität 3×10^{-3} rund 29%, im denervierten Muskel dagegen nur 16%. Diese Unterschiede glichen sich zwar mit steigender Konzentration aus, gleichzeitig wurde aber eine vergleichende Untersuchung zwischen normalem und denerviertem Muskel durch die zunehmende Hemmung der Fermentaktivität wesentlich erschwert. Die Werte aus 6 Untersuchungen bei einer Ca^{++} -Molarität 6×10^{-3} sind in Tab. I zusammengefaßt.

Der zunächst auffallende Befund der quantitativ unterschiedlichen Hemmung der ATP-Spaltung durch Ca^{++} in niederen Konzentrationen im denervierten Muskel gegenüber dem normalen findet vielleicht seine Erklärung durch die wesentlichen Verschiebungen im Mineralhaushalt des Muskels, der denerviert wurde, da gerade diejenigen Ionen in diese Veränderungen einbezogen werden, die für den physiko-

Tabelle 1. ATP-Spaltung im Homogenat des normalen und denervierten *M. gastrocnemius* der Ratte bei einer Ca^{++} -Molarität 6×10^{-3} .

Versuchs- Nummer	Normaler Muskel (li.)	Denervierter Muskel (re.)	Differenz li./re. %
	γ P/mg Frischsubstanz		
1	15,2	10,6	— 30,3
2	12,2	11,0	— 9,8
3	13,7	11,8	— 13,9
4	12,1	12,4	+ 2,4
5	12,9	10,3	— 20,1
6	7,9	5,7	— 27,9
DW:	12,3	10,3	— 16,3

chemischen Zustand des Myosin von wesentlicher Bedeutung sein dürften. Ob der erhöhte Ca/K-Quotient des denervierten Muskels³⁴ hierbei eine Rolle spielt, wäre zu diskutieren. Von SNELLMAN⁶² wird eine Blockierung der spezifischen Haftstellen des Myosin für ATP durch Ca^{++} beschrieben. Danach müßte angenommen werden,

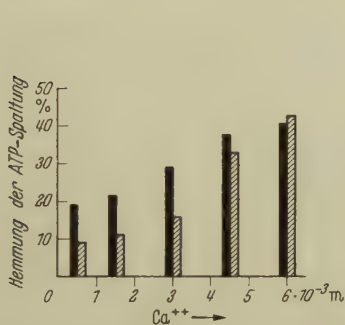


Abb. 4.

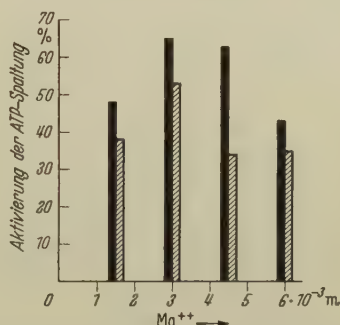


Abb. 5.

Abb. 4. Die ATP-Spaltung wird im Homogenat des normalen (—) und des denervierten (▨) *M. gastrocnemius* der Ratte im pH-Bereich 7,0–9,0 unter der Einwirkung von Ca^{++} in steigenden Konzentrationen zunehmend gehemmt.

Abb. 5. Die ATP-Spaltung wird im Homogenat des normalen (—) und des denervierten (▨) *M. gastrocnemius* der Ratte unter dem Einfluß von Mg^{++} deutlich aktiviert.

daß der denervierte Muskel bereits in dieser Weise in seiner ATPase-Aktivität gehemmt ist.

Ein wesentlich einheitlicheres Verhalten zeigten die Versuche bei Zusatz von Mg^{++} . Gegenüber dem Homogenat ohne Zusatz von Erdalkali-Ionen betrug die maximale Aktivierung bei einer Mg^{++} -Molarität von 3×10^{-3} rund 65% im normalen und rund 53% im denervierten Muskel (siehe Abb. 5).

Auch bei höheren Konzentrationen, in den vorliegenden Versuchen bis 6×10^{-3} , blieb die sehr erhebliche Aktivierung deutlich und betrug bei Mg^{++} -Molarität 6×10^{-3} rund 43% im normalen und rund 35% im denervierten Muskel.

Wenn man annimmt, daß die ATPase im denervierten Muskel durch Blockierung der spezifischen Haftgruppen für ATP durch Ca^{++} in ihrer Aktivität gehemmt ist, so wird man damit auch erklären können, daß die Aktivierung durch Mg^{++} im denervierten Muskel nicht die gleiche prozentuale Größe erreicht wie im normalen.

Die bisher aufgeführten Untersuchungen deuteten auf quantitative Unterschiede des Umfangs der ATP-Spaltung im denervierten Muskel. Durch gleichzeitige Bestimmung des Eiweißgehaltes in beiden Muskeln und Beziehung der ATP-Spaltung auf Proteingehalt und Frischgewicht sollte diese Differenz genauer erfaßt werden.

In drei Serien von je 15 Versuchen wurde die ATP-Spaltung wie vorher bestimmt. Tab. 2 faßt die Versuchsergebnisse der ersten Serie zusammen.

Tabelle 2. *ATP-Spaltung im Homogenat des normalen und des denervierten M. gastrocnemius der Ratte, ohne Zusatz von Erdalkali-Ionen.*

Vers. Nr.	Normaler Muskel (li. M. gastrocnemius)			Denervierter Muskel (re. M. gastrocnemius)			Differenz in der ATP-Spaltung li./re.	
	Protein- gehalt %	P/mg Frisch- gewicht γ	P/mg Protein γ	Protein- gehalt %	P/mg Frisch- gewicht γ	P/mg Protein γ	bezogen auf:	
							Frisch- gewicht ‰	Protein- gehalt ‰
1	18,80	39,4	209,6	16,50	28,5	172,1	—28,4	—13,1
2	18,81	36,5	194,2	15,21	24,7	162,5	—32,3	—16,3
3	17,01	30,8	181,1	14,50	20,5	141,5	—30,2	—21,8
4	19,20	24,3	126,6	16,41	14,7	100,1	—39,5	—20,8
5	17,53	21,5	122,8	15,61	19,0	121,8	—11,6	— 0,8
6	18,13	25,5	140,5	15,94	20,0	125,2	—21,6	—10,9
7	16,88	20,9	123,5	19,57	19,0	95,2	— 9,9	—22,8
8	19,63	25,3	128,9	18,75	15,9	82,8	—37,8	—36,5
9	16,72	18,2	107,6	16,09	15,6	96,6	—14,3	—10,3
10	19,06	24,8	129,7	17,19	11,8	68,6	—52,5	—40,1
11	17,75	24,4	135,9	16,56	21,6	130,4	—11,3	— 4,0
12	19,19	24,1	125,7	15,40	14,6	95,0	—39,4	—24,4
13	20,00	34,8	174,0	17,51	29,2	164,9	—16,1	— 5,7
14	16,56	21,6	130,0	15,93	23,0	144,4	+ 6,1	+11,0
15	19,31	24,8	128,5	15,84	16,9	106,8	—31,9	—16,8
DW	18,30	26,46	143,91	16,47	19,66	120,53	—25,7	—16,2
σ	±1,015	±6,129	±30,310	±1,334	±5,069	±32,280		
ε	±0,298	±1,583	±7,826	±0,345	±1,399	±8,596		

Der durchschnittliche Proteinverlust im denervierten Muskel betrug rund 10,0% und erwies sich als statistisch signifikant ($P \leq 0,01$). Nur in einem Versuch (Nr. 14, Tab. 2) war die ATP-Spaltung im denervierten Muskel um rund 6,1% im Frischgewicht und rund 11,0% bei Bezug auf den Proteingehalt größer als im normalen Muskel. In allen übrigen Versuchen war sie deutlich herabgesetzt und die durchschnittliche Differenz

aus 15 Versuchen betrug rund 25,7% auf Frischgewicht und rund 16,2% auf Proteingehalt; die Unterschiede erwiesen sich bei einem P-Wert $< 0,01$ für Frischgewicht und P-Wert $\leq 0,05$ für Protein als statistisch signifikant.

Wurde den Versuchsansätzen bei im übrigen unveränderten Bedingungen Ca^{++} zugefügt, so erwies sich auch hier die ATP-Spaltung im denervierten Muskel sowohl für die Frischsubstanz ($P \leq 0,01$) wie für den Proteingehalt ($P \leq 0,05$) als signifikant herabgesetzt, wie die in Tab. 3 zusammengefaßten Werte zeigen.

Tabelle 3. ATP-Spaltung des normalen und denervierten *M. gastrocnemius* der Ratte unter dem Einfluß von Ca^{++} in einer Molarität 3×10^{-3} , pH 7,4.

Vers. Nr.	Normaler Muskel (li. M. gastrocnemius)			Denervierter Muskel (re. M. gastrocnemius)			Differenz in der ATP-Spaltung li./re.	
	Protein- gehalt %	P/mg Frisch- gewicht %	P/mg Protein %	Protein- gehalt %	P/mg Frisch- gewicht %	P/mg Protein %	bezogen auf: Frisch- gewicht %	Protein- gehalt %
1	21,56	21,5	99,5	18,75	19,6	104,3	— 8,8	+ 4,8
2	21,25	24,3	114,9	19,75	12,2	62,1	—49,9	—45,6
3	15,94	25,2	158,3	14,85	22,6	153,0	—10,3	— 3,4
4	19,63	21,7	110,5	18,75	13,5	71,8	—37,8	—34,9
5	16,72	16,0	94,2	16,09	14,6	90,7	— 8,8	— 3,7
6	19,06	20,5	107,3	17,19	16,0	92,7	—21,9	—13,6
7	16,56	27,6	154,1	17,75	23,0	138,7	—16,7	— 8,1
8	19,19	18,2	95,0	15,40	11,4	74,0	—37,4	—22,1
9	20,00	19,7	98,6	17,51	15,4	86,8	—21,8	—11,9
10	18,80	28,2	150,0	16,50	18,5	112,1	—34,1	—25,3
11	16,56	16,6	99,9	15,93	15,4	96,7	— 7,2	— 3,2
12	19,31	24,8	128,5	15,84	16,9	106,8	—31,5	—16,9
13	18,70	33,0	177,8	18,00	27,5	152,6	—17,4	—14,2
14	19,41	27,2	140,1	17,92	24,8	138,4	— 8,8	— 1,2
15	16,88	18,2	107,8	19,57	15,2	77,5	—16,5	—28,1
DW	18,64	22,86	122,43	17,32	17,90	103,88	—21,7	—15,1
σ	$\pm 1,976$	$\pm 4,730$	$\pm 26,625$	$\pm 2,439$	$\pm 4,939$	$\pm 29,870$		
ε	$\pm 0,042$	$\pm 1,264$	$\pm 6,873$	$\pm 0,629$	$\pm 1,275$	$\pm 7,713$		

In Tab. 4 werden die Werte für die ATP-Spaltung wiedergegeben, wie sie nach Zusatz von 3×10^{-3} Mol Mg^{++} erhoben wurden. Bei Berechnung auf Frischgewicht lag die ATP-Spaltung im denervierten Muskel in allen Versuchen auch hier unter der des normalen. Die Differenz betrug durchschnittlich 28,1% und darf bei einem P-Wert $\geq 0,05$ noch als statistisch gesichert gelten. Bei Berechnung auf den Proteingehalt lag die ATP-Spaltung im denervierten Muskel im Versuch 2 um rund 0,8% und im Versuch 9 um rund 4,9% höher als im normalen *M. gastrocnemius*. In allen übrigen Versuchen war die ATP-Spaltung ebenfalls deutlich herab-

gesetzt, die Differenz der Mittelwerte aus 15 Versuchen betrug rund 20,8%. Wenn sie auch infolge der sehr großen Streubreite der erhobenen Versuchswerte statistisch noch keinen signifikanten Unterschied ausdrückt ($P \geq 0,05$), so dürfte ihr bei dem gleichsinnigen Verhalten in 13 von 15 Versuchen doch eine reelle Bedeutung zukommen.

Tabelle 4. *ATP-Spaltung des normalen und des denervierten M. gastrocnemius der Ratte unter dem Einfluß von Mg^{++} in einer Molarität 3×10^{-3} , p_H 7,4.*

Vers. Nr.	Normaler Muskel (li. M. gastrocnemius)			Denervierter Muskel (re. M. gastrocnemius)			Differenz in der ATP-Spaltung li./re.	
	Protein- gehalt	P/mg Frisch- gewicht	P/mg Protein	Protein- gehalt	P/mg Frisch- gewicht	P/mg Protein	bezogen auf:	
	%	γ	γ	%	γ	γ	Frisch- gewicht %	Protein- gehalt %
1	—	43,0	—	—	28,5	—	—33,7	
2	17,50	33,0	188,4	15,13	29,3	176,1	—11,2	— 6,4
3	15,94	24,4	153,5	14,85	23,3	156,3	— 4,5	+ 0,8
4	18,13	33,8	186,5	15,94	21,8	136,9	—35,5	—26,7
5	16,88	30,0	177,4	19,57	23,8	111,1	—20,6	—37,3
6	19,63	33,1	168,6	18,75	15,6	82,9	—52,9	—50,8
7	16,72	20,9	123,3	16,09	18,2	113,1	—12,9	— 8,3
8	19,06	29,6	172,2	17,19	17,9	103,9	—39,5	—35,9
9	17,75	36,8	206,8	16,56	34,5	217,4	— 6,3	+ 4,9
10	19,19	25,3	131,7	15,40	20,3	121,9	—19,8	— 7,4
11	18,80	42,0	223,4	16,50	23,3	141,2	—44,5	—36,9
12	19,30	46,6	241,4	15,84	32,8	206,3	—29,5	—14,5
13	21,25	24,5	115,4	19,75	15,6	86,6	—36,3	—24,9
14	—	27,3	—	—	21,4	—	—21,6	
15	18,75	34,2	183,7	15,19	21,9	144,5	—35,9	—21,3
DW	18,38	32,30	174,79	16,56	23,21	138,33	—28,1	—20,8
σ	±1,433	±8,000	±37,380	±1,750	±5,191	±42,690		
ε	±0,397	±2,066	±10,365	±0,508	±1,358	±11,815		

Aus dem Vergleich der Durchschnittswerte der Tab. 2—4 wird außerdem der bereits beschriebene hemmende Effekt der Ca^{++} , in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von STEINBACH⁶⁵, und die erhebliche Aktivierung der ATP-Spaltung durch Mg^{++} im normalen wie im denervierten Muskel deutlich. Führt man die Aktivierung der ATP-Spaltung vor allem auf die Wirksamkeit des Mg -aktivierten Enzyms von KIELLEY und MEYERHOF zurück, so wird man in Anbetracht der großen Instabilität dieses Fermentes die große Streubreite der einzelnen Versuchswerte verstehen.

Da die Versuche im Homogenat durchgeführt wurden, wird man aber weiterhin eine eventuelle weitere Spaltung der ATP durch die Myokinase bzw. ADPase (s. KALCKAR³⁶) berücksichtigen müssen. Wenn man unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Aktivierung dieser Fermente vernachlässigen darf (SWANSON⁶⁶), bleibt noch zu erwägen, ob das Myosin im vorliegenden Homogenat mehr oder

weniger in seiner Bindung an Actin, und bei dem niedrigen Kaliumgehalt, als Gel vorliegt; für Actomyosin gel ist die Aktivierbarkeit seiner ATPase-Wirksamkeit durch Mg^{++} beschrieben worden (u. a. SPICER u. BOWEN⁶³, s. auch WEBER⁷³).

Das Verhalten des Wasserhaushaltes wird in Tab. 5 wiedergegeben. In 21 von 25 Versuchen fand sich eine Abnahme, in 4 Versuchen eine Erhöhung des Gehaltes an Trockensubstanz bei einer durchschnittlichen Differenz aus 25 Versuchen von rund 2,7%, die sich bei einem P-Wert $\geq 0,05$ statistisch noch nicht als signifikant erwies. Deutlichere Unterschiede ergaben sich aus der vergleichenden Untersuchung des Chlorgehaltes in den beiden Muskeln. Cl^- war im denervierten Muskel gegen-

Tabelle 5. Verhalten von Trockensubstanz und Chlorgehalt im normalen und denervierten *M. gastrocnemius* der Ratte.

Vers. Nr.	Normaler Muskel (li. M. gastrocnemius)			Denervierter Muskel (re. M. gastrocnemius)			Differenz im Chlorgehalt li./re. %	
	Trocken- substanz %	Chlorgehalt, mg%		Trocken- substanz %	Chlorgehalt, mg%		Frisch- substanz	Trocken- substanz
		Frisch- substanz	Trocken- substanz		Frisch- substanz	Trocken- substanz		
1	24,10	108,7	450,9	23,39	106,0	453,7	— 2,5	+ 0,6
2	23,68	92,8	392,3	22,33	87,5	391,8	— 5,7	— 0,1
3	24,62	84,8	345,1	24,08	84,8	351,9	—	+ 1,9
4	23,67	71,6	302,7	23,85	79,5	333,1	+ 9,9	+ 9,1
5	23,26	84,8	364,6	23,74	84,8	357,9	—	— 1,9
6	23,93	79,4	331,7	23,22	87,0	375,1	+ 8,7	+11,6
7	23,76	95,4	401,6	22,84	116,6	510,7	+18,2	+21,4
8	24,36	106,0	453,7	23,36	159,0	682,1	+50,0	+50,3
9	23,72	107,1	451,8	23,97	122,0	510,0	+13,9	+11,4
10	24,84	112,1	451,6	24,13	107,1	444,3	— 4,5	— 3,8
11	24,05	107,1	445,4	23,50	107,1	456,1	—	+ 2,3
12	25,34	99,6	393,4	23,28	118,3	508,7	+15,8	+28,1
13	21,80	112,1	514,3	23,83	144,4	606,6	+22,4	+17,9
14	24,24	99,6	411,4	22,81	124,5	546,6	+20,0	+32,8
15	23,62	112,1	475,1	23,55	129,5	550,3	+13,4	+15,8
16	23,50	84,7	360,7	22,85	125,4	549,2	+48,1	+51,9
17	23,37	89,6	383,7	23,19	116,6	503,7	+23,2	+24,0
18	22,96	102,1	445,1	21,75	114,5	526,9	+10,8	+15,5
19	22,81	82,2	360,7	22,02	84,7	385,2	+ 2,7	+ 6,4
20	23,76	104,6	440,3	21,79	114,5	525,7	+ 8,6	+16,2
21	23,12	79,7	345,0	22,79	78,4	344,4	— 1,7	— 0,2
22	23,52	85,9	366,0	21,94	117,0	533,7	+18,0	+45,9
23	23,60	82,2	348,4	23,40	96,9	413,5	+14,9	+15,4
24	24,46	92,1	376,8	23,67	102,1	431,8	+ 9,8	+12,5
25	23,89	74,7	313,0	23,43	139,4	595,4	+86,6	+90,2
DW	23,76	94,0	397,0	23,12	108,3	475,4	+15,2	+19,8
σ	$\pm 0,714$	$\pm 3,919$	$\pm 49,080$	$\pm 0,718$	$\pm 6,496$	$\pm 90,133$		
ε	$\pm 0,143$	$\pm 0,784$	$\pm 5,816$	$\pm 0,144$	$\pm 1,297$	$\pm 6,026$		

über dem normalen um rund 15,2% ($P \leq 0,001$) in der Frisch- und rund 19,8% ($P \leq 0,05$) in der Trockensubstanz signifikant erhöht.

Setzt man voraus, daß die Muskelfaser auf Grund der Struktur ihrer Grenzsichten praktisch kein Cl^- enthält, so geht aus der Zunahme des Chlorgehaltes im denervierten Muskel hervor, daß sein interstitieller Raum zum Zeitpunkt der Untersuchung um wenigstens rund 15% gegenüber dem normalen Muskel vergrößert ist.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß die ATP-Spaltung des denervierten atrophischen Muskels in einem Umfange herabgesetzt ist, wie er durch die Vergrößerung des interfibrillären Raumes oder die Abnahme des Gesamtproteingehaltes allein nicht erklärt werden kann. Berücksichtigt man aber die einleitend erwähnten gleichzeitigen Verschiebungen in der Zusammensetzung der Eiweißkörper, wie sie im Elektrophoresediagramm sehr deutlich zum Ausdruck kommen, so dürfte die Verminderung der ATP-Spaltung im denervierten atrophischen Muskel seinem herabgesetzten Globulingehalt entsprechen. Vernachlässigt man die beschriebenen geringfügigen Veränderungen (siehe Abb. 4 und 5), die aus den Verschiebungen im Mineralhaushalt resultieren dürften, so ergeben sich keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich pH -Optimum und Beeinflussung der Aktivität durch die Erdalkali-Ionen gegenüber dem normalen Muskel.

Diskussion.

Den mitgeteilten Befunden, am denervierten atrophischen Muskel erhoben, dürfte vor allem eine Bedeutung für die Klärung solcher klinischer Krankheitsbilder zukommen, denen Veränderungen an muskulösen Organen infolge gestörter nervöser Versorgung oder verminderter Aktivität zugrunde liegt.

Wenn der denervierte atrophische Muskel bei unveränderten Energiereserven in Form von Glykogen⁸ und verminderter Speicherung von energiereichen Phosphatverbindungen wie ATP und Kreatinphosphat³⁴ trotz des „Fibrillierens“ seiner Fasern (siehe TOWER⁶⁹) eine Verminderung nicht nur der oxydativen Phosphorylierungsprozesse⁷⁰, sondern auch eine herabgesetzte Spaltungsfähigkeit für die ATP erkennen läßt, wird dieses Verhalten als Ausdruck eines verminderten Energiebedarfs infolge herabgesetzter Arbeitsleistung zu deuten sein.

Da die ATPase des Myosins wahrscheinlich zur Kontraktion des Muskels, das im Sarkoplasma lokalisierte Ferment von KIELLEY und MEYERHOF dagegen ähnlich der ATPase anderer Organe, wie z. B. der Leber^{37, 53, 59, 66}, mehr zu den allgemeinen Stoffwechselprozessen in Beziehung stehen dürfte⁵², wäre denkbar, daß sich die quantitativen Veränderungen, vor allem der letzteren, z. B. auch auf den Kohlenhydratstoffwechsel des denervierten Muskels auswirken; denn der ungestörte Ablauf der Glykolyse ist nicht nur davon abhängig, daß genügend anorganisches Phosphat und genügend Phosphatacceptoren zur Verfügung stehen, sondern auch davon, daß die gebildeten energiereichen Phosphatverbindungen fortlaufend entladen werden. Eine Stockung im Entladungsprozeß führt zu einer Bremsung des

gesamten Stoffwechsels (WEIL-MALHERBE⁷⁴). Es wäre somit möglich, daß der verminderte Bedarf an Kontraktionsenergie auf diese Weise den Stoffwechsel des denervierten Muskels bremst und seine Atrophie einleitet.

Während die Wirksamkeit der Mg-ATPase an die cholinhaltige Komponente des Ferments geknüpft zu sein scheint⁴⁰, ist die Aktivität der Myosin-ATPase in gleicher Weise wie die Wechselwirkung zwischen Actin und Myosin von der Anwesenheit von SH-Gruppen abhängig^{2, 3, 71}. Entsprechend erfährt ihre Aktivität bei gleichzeitiger Beeinflussung der Muskelaktivität, z. B. durch eine schnellere Ermüdbarkeit des direkt gereizten Muskels⁴¹, eine Hemmung durch SH-Reagentien^{5, 42, 61} sowie durch Nihydrin²⁸, Hypophysenvorderlappenextrakt⁵, Adrenochrom¹⁷ usw. Es wäre daher noch zu prüfen, ob die Abnahme der ATPase-Wirksamkeit des denervierten Muskels mit einer nachweisbaren Verminderung dieser SH-Gruppen einhergeht.

Wenn die Vermutung von BINKLEY und OLSON⁶ zutrifft, daß die Mg-ATPase vor allem in den nervösen Elementen des Muskels vorhanden ist, würde verständlich, daß die Struktur der Muskelfasergrenzschichten, mit denen diese aufs engste verknüpft sind, offenbar bereits in den ersten Tagen nach Denervierung einsetzende Veränderungen erkennen lassen, die von einer veränderten Erregbarkeit des Muskels (s. TOWER⁶⁹) und einer veränderten Membranruheladung⁷ gefolgt sind und auf die enge Kopplung von energieliefernden Stoffwechselprozessen und Membranstruktur hinweisen. Dementsprechend ist zu erwarten, daß weitere Enzymsysteme, vor allem solche, die dem Stofftransport in die Zelle dienen und daher vor allem ihre Wirksamkeit an den Grenzflächen entfalten, wie z. B. die Hexokinase⁵⁶, und den Phosphattransport vermittelnde Fermente^{12, 29} Veränderungen ihrer Wirksamkeit erkennen lassen. Die Untersuchungen in dieser Richtung werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

Im denervierten atrophischen *M. gastrocnemius* der Ratte (30—40 Tage nach Resektion des N. ischiadicus rechts) war die ATP-Spaltung des Homogenates im Vergleich zum Muskel der contralateralen Seite deutlich herabgesetzt. Größere quantitative Unterschiede hinsichtlich pH-Optimum und Aktivierbarkeit durch Erdalkali-Ionen (Ca^{++} bzw. Mg^{++}) bestanden nicht. Die Befunde werden im Zusammenhang mit Veränderungen in der Zusammensetzung der Eiweißkörper und dem Verhalten des interstitiellen Raumes diskutiert.

Literatur.

- ¹ BAILEY, K.: *Biochemic. J.* **36**, 121 (1942). — ² BAILEY, K., and B. B. MARSH: *Biochim. et Biophysic. Acta* **9**, 133 (1952). — ³ BAILEY, K., and S. V. PERRY: *Biochim. et Biophysic. Acta* **1**, 506 (1947). — ⁴ BAREY, R.: *Biol. Rev. Cambridge philos. Soc.* **23**, 159 (1948). — ⁵ BINKLEY, F.: *Science (Lancaster, Pa.)* **109**, 88 (1949). — ⁶ BINKLEY, F., and C. K. OLSON: *J. of Biol. Chem.* **186**, 725 (1950). — ⁷ BOGATZKI, M.: *Z. exper. Med.* **118**, 544 (1952). — ⁸ BOGATZKI, M., C. G. SCHMIDT u. L. FISCHER: *Z. exper. Med.* **119**, 457 (1952). — ⁹ BURN, J. H.: *Statistische Auswertungsmethoden*. Berlin 1937. — ¹⁰ CAREY, M. M., and D. D. DIEWIATKOWSKI: *J. of Biol. Chem.* **179**, 119 (1949). — ¹¹ CAUSEY, G., and E. J. HARRIS: *Biochemic. J.* **49**, 176 (1951). — ¹² CREPAX, P.: *Arch. Sci. biol., Bologna* **33**, 362 (1949). — ¹³ CREPAX, P.: *Experientia* **5**, 167 (1949). — ¹⁴ DICKENS, F., and G. E. GLOCK: *J. of Physiol.* **113**, 24 (1951). — ¹⁵ DRAPER, M. H., and A. J. HODGE: *Nature (Lond.)* **163**, 576 (1949). — ¹⁶ DUBOIS, K. P., and V. R. POTTER: *J. of Biol. Chem.* **150**, 185 (1943). — ¹⁷ ENGELHARDT, V. A.: *Biochimia, Moskau* **4**, 716 (1939). — ¹⁸ ENGELHARDT, V. A., and M. N. LIUBI-

- MOWA: *Nature* (Lond.) **144**, 668 (1939). — ¹⁹ FISCHER, E.: *Arch. physic. Ther.* (Am.) **25**, 709 (1944). — ²⁰ FISCHER, E.: *Arch. physic. Med.* (Am.) **29**, 291 (1948). — ²¹ FISCHER, E., R. V. BOWERS, H. V. SKOWLUND, K. W. RYLAND and J. COPENHAVER: *Arch. physic. Med.* (Am.) **30**, 766 (1949). — ²² FISCHER, E., and V. RAMSEY: *Amer. J. Physiol.* **145**, 571, 583 (1946). — ²³ FISKE, C. H., and Y. SUBBAROW: *J. of Biol. Chem.* **76**, 375 (1925). — ²⁴ FLECKENSTEIN, A., W. BROSE, H. J. CANIS u. A. FÖRDERER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **209**, 239 (1950). — ²⁵ FLECKENSTEIN, A., H. HILLE u. W. E. ADAM: *Pflügers Arch.* **253**, 264 (1951). — ²⁶ FLECKENSTEIN, A., E. WAGNER u. K. H. GÖGGL: *Pflügers Arch.* **253**, 38 (1950). — ²⁷ FURASAWA, K. J.: *J. of Physiol. (Brit.)* **67**, 325 (1939). — ²⁸ GILMOUR, D., and J. H. CALABY: *Austral. J. Sci. Res.* **2**, 216 (1949). — ²⁹ GOURLEY, J. R. H.: *Arch. Biochem. et Biophys.* **40**, 1 (1952). — ³⁰ HAAN, A. M. F. H.: *Biochim. et Biophys. Acta* **8**, 346 (1952). — ³¹ HALL, C. E., M. A. JAKUS and F. O. SCHMITT: *Biol. Bull. Mar. biol. Labor. Wood's Hole* **90**, 32 (1946). — ³² HINES, H. M., and G. C. KNOWLTON: *Amer. J. Physiol.* **104**, 51, 379 (1933). — ³³ HÖBER, R.: *Physical Chemistry of Cells and Tissues*. London 1947. — ³⁴ HUMOLLER, F. L., B. GRISWOLD and MCINTYRE: *Amer. J. Physiol.* **161**, 406 (1950). — ³⁵ JACOBI, H. P., S. ROSENBLATT, J. P. CHAPPELL and S. MORGULIS: *Arch. Biochem.* **27**, 19, 22 (1950). — ³⁶ KALCKAR, H. M.: in SUMNER, J. B., and MYRBOECK: *The Enzymes* II, 1 S. 151 (1951). — ³⁷ KIELLEY, W. W., and R. K. KIELLEY: *J. of Biol. Chem.* **200**, 213 (1953). — ³⁸ KIELLEY, W. W., and O. MEYERHOF: *J. of Biol. Chem.* **174**, 387 (1948). — ³⁹ KIELLEY, W. W., and O. MEYERHOF: *J. of Biol. Chem.* **176**, 591 (1948). — ⁴⁰ KIELLEY, W. W., and O. MEYERHOF: *J. of Biol. Chem.* **183**, 391 (1950). — ⁴¹ KOSTOJANC, CH. S.: *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* **72**, 981 (1950). — ⁴² KUN, E.: *J. of Biol. Chem.* **187**, 289 (1950). — ⁴³ LANG, K.: *Biochem. Z.* **290**, 289 (1937). — ⁴⁴ LEHNARTZ, E.: *Zbl. inn. Med.* **1938**, 65. — ⁴⁵ LINDER, A.: *Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*. Basel 1945. — ⁴⁶ LOHMANN, K.: *Biochem. Z.* **281**, 264 (1934). — ⁴⁷ LOHMANN, K.: *Biochem. Z.* **282**, 109 (1935). — ⁴⁸ MOMMAERTS, W. F. H. M., and J. C. RUPP: *Nature* (Lond.) **168**, 957 (1951). — ⁴⁹ NACHMANSON, D., and H. M. JOHN: *J. of Biol. Chem.* **158**, 157 (1945). — ⁵⁰ NACHMANSON, D., and M. BERMAN: *J. of Biol. Chem.* **165**, 551 (1946). — ⁵¹ NEEDHAM, D. M.: *Biochemic. J.* **36**, 113 (1942). — ⁵² NEEDHAM, D. M.: *Advances in Enzymology* **13**, 151 (1952). — ⁵³ NOVIKOFF, A. B., L. HECHT, E. PODBER and J. RYAN: *J. of Biol. Chem.* **194**, 153 (1951). — ⁵⁴ PARNAS, J. K.: *Erg. Enzymforsch.* **6**, 57 (1937). — ⁵⁵ ROTHSCHUH, K. E.: *Elektrophysiologie des Herzens*. Darmstadt 1952. — ⁵⁶ ROTHSTEIN, A.: *Science* (Lancaster, Pa.) **114**, 683 (1951). — ⁵⁷ SCHAEFER, H.: *Elektrophysiologie. I/II*. Wien 1940/42. — ⁵⁸ SCHAEFER, H.: *Das Elektrokardiogramm*. Berlin 1951. — ⁵⁹ SEVES, G. S., and A. A. KOBYLIN: *Biochimija* **16**, 128 (1951). — ⁶⁰ SHANES, A. M.: *Biol. Bull. Mar. biol. Labor. Wood's Hole* **19**, 211 (1946). — ⁶¹ SINGER, T. P., and E. S. G. BARRON: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **56**, 120 (1944). — ⁶² SNELLMANN, O.: *Biochim. et Biophys. Acta* **5**, 56 (1950). — ⁶³ SPICER, S. S., and W. J. BREWEN: *J. of Biol. Chem.* **188**, 741 (1951). — ⁶⁴ STÄMPFLI, R.: 3. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chem. Mosbach/Baden 1952, S. 109. — ⁶⁵ STEINBACH, B. H.: *Arch. Biochem.* **22**, 328 (1949). — ⁶⁶ SWANSON, M. A.: *J. of Biol. Chem.* **191**, 577 (1951). — ⁶⁷ SZENT-GYÖRGYI, A.: *Biochem. et Biophys. Acta* **4**, 38 (1950). — ⁶⁸ SZENT-GYÖRGYI, A.: *Chemistry of Muscular Contraction*. New York 1951. — ⁶⁹ TOWER, S. S.: *Physiol. Rev.* **19**, 1 (1939). — ⁷⁰ VARGA, E. X., K. KOSTYA, E. SZABO u. L. ASCODI: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **210**, 214 (1950). — ⁷¹ WALSH, O. F.: *Nature* (Lond.) **169**, 546 (1952). — ⁷² WEBER, H. H.: *Biochim. et Biophys. Acta* **4**, 12 (1950). — ⁷³ WEBER, H. H., u. H. PORTZEHL: *Erg. Physiol.* **47**, 369 (1952). — ⁷⁴ WEIL-MALHERBE, H.: 3. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chem. Mosbach/Baden 1952, S. 41. — ⁷⁵ WITTENBERG, J., and A. KORNBERG: *J. of Biol. Chem.* **202**, 431 (1953).

Aus dem Max Planck-Institut für Chemie, Mainz
(Chem.-Abt.: Prof. Dr. F. STRASSMANN).

Untersuchungen über den Einfluß der Nebennieren auf die Eliminationsfähigkeit des reticulo-endothelialen Systems für makromolekulare Fremdkörper.

VII. Mitteilung über RES-Clearance.

Von
MAX FRIMMER und KARL PFLEGER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juli 1953.)

In einer vorangegangenen Mitteilung war gezeigt worden, daß die Fähigkeit des RES, intravenös injiziertes Kalium-Natrium-Polyphosphat (PP) zu eliminieren, unter anderem von der Funktionstüchtigkeit der Schilddrüse abhängt (FRIMMER[1]). Der Schilddrüse kommt somit vermutlich ein fördernder Einfluß auf die RES-Clearance zu. Da das RES dem sogenannten aktiven Mesenchym angehört, war auch ein Einfluß der Nebennierenfunktion zu erwarten.

Die Zusammenhänge zwischen Nebenniere und Mesenchym müssen hier als bekannt vorausgesetzt werden. Bereits in früheren Mitteilungen wurden Beobachtungen erwähnt, nach denen Eingriffe (wie z. B. eine tiefe Narkose) die als Stress aufgefaßt werden können, zu einer Beeinträchtigung der RES-Clearance für die Dauer einiger Tage führen (FRIMMER[2]). Weiterhin zeigte sich nach Verabfolgung cytostatischer Stoffe, daß die Kurven, die sich durch Darstellung der RES-Clearancewerte im Laufe einiger Wochen ergaben, reproduzierbar doppelgiptig waren (FRIMMER[3]). Dieses eigenartige Verhalten konnte bisher nicht hinreichend gedeutet werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um überlagerte Regulationen, die durch die Nebennierenfunktion bedingt sind.

Auf den Einfluß des Adrenalins auf die RES-Clearance wurde bereits bei der Schilderung von akuten Kreislaufversuchen mit ^{32}P indiziertem PP eingegangen (FRIMMER u. GÖTTE). Die beobachteten Effekte wurden auf eine Kontraktion der Milz zurückgeführt. Somit konnte diese Arbeit auf die Funktion der Nebennierenrinde beschränkt werden. Die Exstirpation der Nebenniere war wegen der zu erwartenden relativ kurzen Überlebenszeit der Versuchstiere und der unvermeidbaren, kreislaufbedingten Clearanceänderungen für die vorliegende Fragestellung nicht geeignet.

Es wurde deshalb das Verhalten der RES-Clearance nach Injektion von Desoxycorticosteron, Cortison und ACTH untersucht*.

Experimenteller Teil.

Die Versuche wurden an einem heterogenen Material von Hunden durchgeführt. Die Clearanceuntersuchungen wurden in der aus der 2. Mitteilung

* Die Versuchsmengen von Desoxycorticosteron wurden in freundlicher Weise von der Firma Schering, Berlin, von ACTH von den Farbwerken Hoechst und von Cortison von den Farbwerken Hoechst sowie von der Ciba AG. Basel zur Verfügung gestellt.

(FRIMMER[2]) ersichtlichen Weise unter Verwendung von PP ausgeführt, das mit ^{32}P markiert war.

Bei jedem Versuchstier wurden an zwei verschiedenen Tagen Vorversuche durchgeführt. Für die eigentlichen Versuche wurden nur solche Tiere herangezogen,

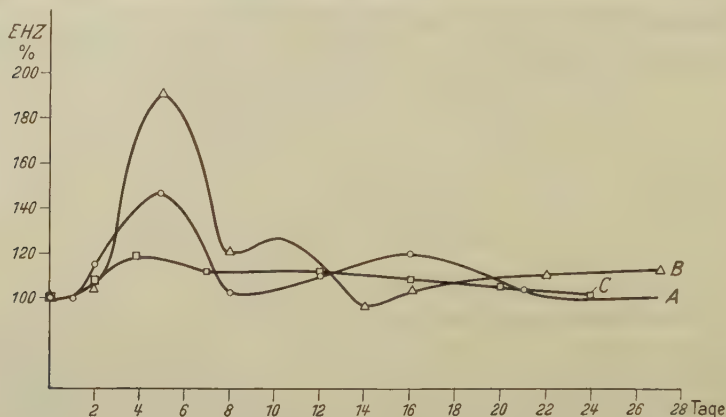


Abb. 1. Verhalten der RES-Clearance nach Verabfolgung von Desoxycorticosteron. (Versuchsdaten siehe Tab. 1.)

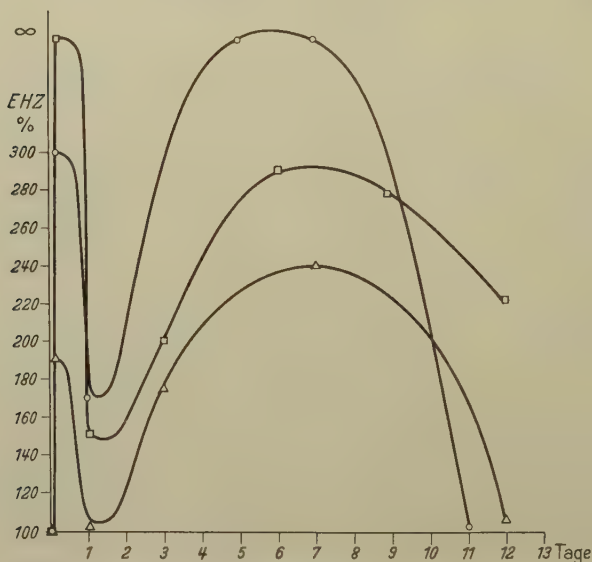


Abb. 2. Verhalten der RES-Clearance nach Verabfolgung von Cortison. (Versuchsdaten siehe Tab. 1.)
D = ○, E = △, F = □.

deren Leerwerte gute Übereinstimmung ergaben. Am Tag 0 des Hauptversuchs erfolgte jeweils die Injektion des zu testenden Wirkstoffs. (Bei den Versuchen mit Desoxycorticosteron wurde am Versuchstag 0 die erste Injektion durchgeführt.) Die Versuchsdaten der einzelnen Tiere sind, soweit die Ergebnisse nachfolgend graphisch dargestellt sind, in Tab. 1 zusammengefaßt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung sämtlicher Versuche verzichtet. Die nicht

dargestellten Versuchsergebnisse stimmen im Rahmen der biologischen Schwankungsbreite gut mit den dargestellten überein. An auswertbaren Versuchen wurden durchgeführt: Mit Desoxycorticosteron 5, mit Cortison 5 und mit ACTH 6.

Tabelle 1.

Wirkstoff	Gesamtdosis	Hund	kg	Injektionen an den Versuchstagen	Anzahl und Höhe der Einzeldosen. Verabfolgt in
Desoxycorti- costeron	30 mg	A	25	0, 1, 2,	3 × 10 mg in 3 Tag.
	70 mg	B	26	0, 1, 2, 3, 4, 5, 7	7 × 10 mg in 8 Tag.
	10 mg	C	24	0	1 × 10 mg
Cortison	50 mg	D	16	0	2 × 25 mg in 2 Std
	100 mg	E	13	0	2 × 50 mg in 2 Std
	500 mg	F	8	0	10 × 50 mg in 5 Std
ACTH	160 E	G	18	0	8 × 20 E in 4 Std
	80 E	H	13	0	4 × 20 E in 3 Std
	100 E	I	8,5	0	10 × 10 E in 5 Std
	120 E	I	8,5	0	3 × 40 E in 2 Std

Ergebnisse.

In Abb. 1 sind die Ergebnisse von drei Versuchen mit Desoxycorticosteron bei verschiedener Dosierung dargestellt. Die in Indexprozente umgerechneten Werte der jeweiligen Eliminationshalbwertzeiten (EHZ) sind gegen die Zeit aufgetragen. Abb. 2 zeigt die in derselben Weise dar-

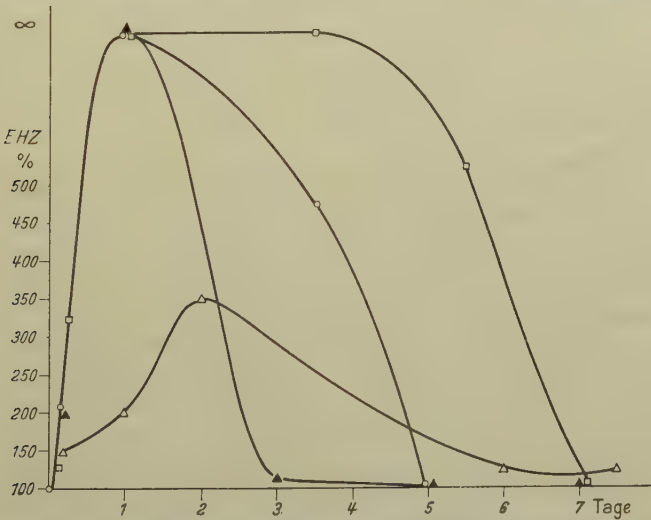


Abb. 3. Verhalten der RES-Clearance nach Verabfolgung von ACTH. (Versuchsdaten siehe Tab. 1.) G = O, H = □, I = ▲ (erster Versuch), I = △ (zweiter Versuch).

gestellten Ergebnisse nach Cortisonverabfolgung. In allen Versuchen erfolgte nach Cortisongabe ein initialer Anstieg, der sein Maximum wenige Stunden nach Injektion bzw. oraler Verabfolgung hatte. Zwischen 24

und 48 Std nach Cortisongabe liegt das Minimum eines Abfalls. Anschließend kommt es zu einem Wiederanstieg, der sein Maximum zwischen dem 5. und 8. Versuchstag hat. Zwischen dem 11. und 17. Tag wird der Normalwert wieder erreicht. In Abb. 3 sind Versuche mit ACTH dargestellt. Hierbei wird das Maximum der Wirkung erst nach 24 bis 48 Std erreicht. Die Wirkungsdauer ist bei den einzelnen Tieren verschieden. Hingegen zeigen mit einer Ausnahme alle Tiere ein völliges Aufhören der Eliminationsleistung. Der EHZ-Wert des Ausnahmefalles ist mit 350% ebenfalls schon außerordentlich hoch. Bemerkenswert ist, daß es sich hierbei um einen Versuch handelt, der 20 Tage nach dem Beginn eines vorausgegangenen ACTH-Versuches begonnen wurde.

Die Beobachtung der Tiere ergab nach den Desoxycorticosteroninjektionen keine Besonderheiten. Hingegen zeigten die Tiere nach ACTH und Cortison, besonders bei hoher Dosierung deutlich Neigung zum Schlafen.

Diskussion.

Die Versuche mit ACTH und Cortison bestätigen durch meßbare Daten die klinisch bekannte Tatsache der Resistenzlosigkeit aller mit diesen Medikamenten behandelten Individuen. Bei den bisherigen Versuchsserien über das Verhalten der RES-Clearance wurden abgesehen von akuten Schockversuchen (FRIMMER u. GÖTTE) keinerlei Beobachtungen gemacht, nach denen es zu einem völligen Erliegen des Eliminationsvermögens des RES kam. Selbst bei hochgradiger Blockade oder toxischer Schädigung des Systems verblieb noch eine Restclearance (FRIMMER[3-5]). Es kann vermutet werden, daß der Nebennierenrinde eine Hemmfunktion für das Eliminationsvermögen des RES zuzuschreiben ist.

Von besonderem Interesse ist der Zeitpunkt des Wirkungseintrittes. Nach Cortisonverabfolgung beginnt die Clearance praktisch sofort abzunehmen. Schon 1 Std nach Injektion wurden in Vorversuchen verlängerte Eliminationshalbwertszeiten gemessen. Leider verbietet es die Eigenart der Testmethode, bei einem Tier etwa in halbstündigen Abständen die Clearance zu bestimmen. Die Zusammenstellung der Ergebnisse mehrerer Einzelversuche an verschiedenen Tieren, bei denen nach verschiedenen langen Zeiten (1—20 Std) nach einmaliger Injektion von 50 mg Cortison die Clearancebestimmung durchgeführt wurde, ergab unter Berücksichtigung der nicht idealen Resorptionsverhältnisse für den suspendierten Wirkstoff einen praktisch sofortigen Wirkungseintritt. Die Wirkung des Cortisons auf das Eliminationsvermögen des RES tritt ebenso sicher ein, wie etwa die Hypoglycämie nach Insulin. Geschwindigkeit und Ausmaß des EHZ-Anstieges dürften eine Funktion der jeweiligen Resorptionsverhältnisse sein. Daneben spielt vermutlich noch die individuelle Empfindlichkeit der Versuchstiere eine gewisse Rolle, was bei

einem heterogenen Tiermaterial nicht weiter verwunderlich wäre. Nicht sicher erklärbar ist der biphasische Verlauf der Kurven.

Als vorläufige Arbeitshypothese kann vielleicht angenommen werden, daß die eigentliche Cortisonwirkung nach 24—48 Std abgeklungen ist. Vielleicht kommt es nach einer anfänglichen Hemmung der Nebennierenfunktion über die Hypophyse zu einer sekundären Ausschüttung von ACTH und Cortison. Die ACTH-Wirkung setzt, wie Abb. 3 zeigt, etwas langsamer ein als die des Cortisons. Die Kurven zeigen, wie zu erwarten war, nur einen Gipfel bzw. ein Plateau. Der bereits zitierte Befund einer verlangsamt und geringgradigeren Reaktion bei Wiederholung des ACTH-Versuches nach 20 Tagen entspricht möglicherweise einer Abnahme der Empfindlichkeit des Systems. Es wäre jedoch verfrüht, aus diesem Einzelbefund allgemeine Schlüsse zu ziehen. Vergleicht man bei den ACTH- und Cortisonversuchen die verabfolgte Dosis mit der gemessenen Wirkung, so läßt sich im Bereich der angewandten Wirkstoffmengen eine Dosisabhängigkeit nicht feststellen. Resorptionsverhältnisse und individuelle Reaktionsbereitschaft dürften für dieses Verhalten verantwortlich zu machen sein. Zu bemerken ist noch, daß die perorale Gabe von Cortison keine Minderung der Wirksamkeit zu bedingen scheint, sondern eher eine Verbesserung. Da die Leber das Haupteliminationsorgan für PP ist, wäre es vorstellbar, daß die Wirksamkeit des Hormons via Pfortader auf das RES der Leber ausgeprägt ist.

Die Versuche mit Desoxycorticosteron hatten vorwiegend den Zweck, die Spezifität der Cortisonwirkung nachzuweisen. Tatsächlich ergaben diese Kontrollversuche ein sowohl qualitativ als auch quantitativ völlig andersartiges Verhalten. Die Clearanceänderungen sind hierbei im Vergleich zur Cortison- und ACTH-Wirkung verhältnismäßig geringfügig und von kürzerer Dauer. Ferner besteht eine Dosisabhängigkeit.

Außerordentlich schwierig ist eine Deutung des Mechanismus des plötzlichen Ausfalls der Eliminationsfunktion des RES nach Verabfolgung von Cortison und ACTH. Der Ausfall des Eliminationsvermögens kann durch Kreislaufwirkungen allein sicher nicht erklärt werden. Die Tiere müßten sich dann in einem kollapsartigen Zustand befunden haben. In drei Fällen wurde versucht, durch Pendiomidinjektion eine Zunahme der Clearance zu erzielen, sobald die Tiere kein Eliminationsvermögen mehr zeigten. [Die Theorie der Pendiomidwirkung im akuten Kreislaufexperiment auf die RES-Clearance wurde an anderer Stelle abgehandelt (FRIMMER[2]; FRIMMER u. GÖTTE)]. In keinem Falle gelang es jedoch, den Clearancewert signifikant zu ändern. Die Wirksamkeit des Cortisons ist wahrscheinlich auf eine direkte Einwirkung auf die Zellen des RES zu beziehen. Es sei daran erinnert, daß es unter ACTH und Cortison zu einem Abbau von lymphatischem Gewebe kommt und daß am gesamten Mesenchym tiefgreifende Veränderungen vorgehen.

Wir möchten für das Erliegen der Eliminationsfähigkeit des RES zwei Möglichkeiten zur Diskussion stellen. Auf der einen Seite kann es durch Abbau von aktivem Gewebe zu einer Verminderung der adsorbierenden RES-Gesamtoberfläche kommen. Andererseits muß bei so tiefgreifenden Reaktionen an diesem System mit einer Veränderung der elektrischen Ladung seiner Oberfläche gerechnet werden. So könnte z. B. durch eine Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration an der

Oberfläche des Systems nach der sauren Seite hin eine verminderte Affinität zu dem sauren PP zustande kommen. Über diesen Fragenkomplex soll im Rahmen einer Untersuchungsreihe über das Verhalten der RES-Clearance bei immunbiologischen Reaktionen berichtet werden (FRIMMER [6-7]).

Die Feststellung einer starken Wirksamkeit des Cortisons auf die Eliminationsfähigkeit des RES für Makromoleküle kann möglicherweise auch zur Deutung bisher ungeklärter Befunde aus früheren Mitteilungen herangezogen werden. Es muß daran gedacht werden, daß es bei den jeweils durchgeführten Eingriffen sekundär zu einer Beteiligung des Hypophysen-Nebennieren-Systems kommen kann. Da nun aber offensichtlich eine Cortisonausschüttung eine Clearanceeinschränkung bewirkt, kann sich dieser sekundäre Vorgang dem primären überlagern. Im Zusammenhang mit den vorangegangenen Untersuchungen über die Beeinflussung der RES-Clearance durch die Schilddrüse (FRIMMER [1]) sei an die bekannten Wechselwirkungen dieses Organs mit der Nebenniere erinnert (siehe GRAB). Auch für die entsprechenden Untersuchungen nach Verabfolgung von cytostatischen Stoffen sowie Pyrufer und dergl. muß nach dem Stand des Wissens mit einer Reaktion der Nebennierenrinde gerechnet werden. In Ergänzung zu früheren Ausführungen darf angenommen werden, daß die Verminderung der RES-Clearance nach schweren Eingriffen am Versuchstier, die als Stress gefaßt werden können, nicht allein über den Blutkreislauf erklärt werden müssen, sondern auch durch direkte Einwirkung der Nebennierenrindenhormone auf die Zellen des RES zustande kommen können.

Zusammenfassung.

1. In Analogie zu der klinisch bekannten Resistenzminderung nach Verabfolgung von Cortison und ACTH läßt sich mit dem Test der Polyphosphateclearance im Tierversuch eine erhebliche Abnahme der Eliminationsfähigkeit des RES nachweisen, wobei es vielfach zu einem völligen Ausfall des Eliminationsvermögens kommt.
2. Unterschiede des Verhaltens der RES-Clearance nach Verabfolgung von ACTH und Cortison werden beschrieben.
3. Kontrollversuche mit Desoxycorticosteronacetat ergeben Veränderungen von geringerem Ausmaß und kürzerer Dauer.
4. Der Nebennierenrinde wird eine physiologische Hemmung des Eliminationsvermögens des RES zugeschrieben.

Literatur.

FRIMMER, M.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (in Druck); (2) **218**, 313 (1953); (3) **220**, 334 (1953); (4) **21**, 91 (1953); (5) **218**, 320 (1953). — (6) Z. f. Immunitätsforsch. **110**, 436 (1953); (7) ebenda (in Druck). — FRIMMER, M., u. H. GÖTTE: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 319 (1953). — GRAB, W.: Verhandlungen der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft 18. Tagung 1951. Sonderausgabe des Arch. exper. Path. u. Pharmakol.

Dr. MAX FRIMMER, Münster/Westf., Westring 12.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen.

Pharmakologische Beeinflussung von Vagusreizeffekten am Froschherzen*.

Von

F. SCHULTZE und L. LENDLE.

(Eingegangen am 24. August 1953.)

Die hemmende Vaguswirkung auf die Herzautomatie kann durch eine Reihe von Pharmaka aufgehoben werden, die außer am Herzen sonst keine parasympathicus-antagonistische Eigenschaften besitzen. Man wird ihnen also auch keine allgemein antagonistischen Wirkungen gegenüber dem Überträgerstoff Acetylcholin am Erfolgsorgan zuschreiben können, wie dem Atropin oder ähnlichen Parasympathicolytika.

Unter diesen Stoffen dürfte die Vaguswirkung des Nicotins einigermaßen geklärt sein. Seit SCHMIEDEBERGS klassischen Untersuchungen nimmt man an, daß Nicotin die intrakardialen Ganglien des Vagus im Herzen lähmt und damit Reizwirkungen, die am Vagusstamm gesetzt werden, durch Blockierung der Erregungsübertragung im Ganglion ausschaltet. Nicotin hebt dagegen nicht die Wirkung peripher parasympathischer Erregerstoffe am Herzen auf. Neben diesem typischen ersten „Ganglienblocker“ Nicotin dürfte eine gleiche Blockierung der Vaguswirkung auch noch einigen anderen Pharmaka zukommen, wie ERDMANN und MERCKER es neuerdings mit besonderem Verfahren der Reizprüfung am Warmblüter (Frequenzspektrum) ermitteln konnten. Sie fanden eine solche Hemmung des Vagus-effektes über intrakardiale Synapsen, besonders der Ganglien, z. B. für Barbiturate, auch Urethan, d-Tubocurarin und Tetraäthylammonium.

In der älteren Literatur liegen vielseitige Berichte auch besonders nach Untersuchungen am Froschherzen bei Vagusreizung vor, in denen keinesfalls eine echte Vaguslähmung im Sinne des Atropins oder Nicotins eine Rolle spielen können, weil keine gleichartigen Antagonismen gegenüber Acetylcholin oder anderen Vagusstoffen bestehen und weil über eine Hemmung der Freisetzung des Überträgerstoffes unter ihrem Einfluß auch keine Beweise bekannt sind.

HARNACK u. WITKOWSKI beschrieben 1876 die Aufhebung von Vagusreizwirkungen (elektrisch und mit Muscarin) durch Campher. Sie betonten Unterschiede gegenüber der Atropinlähmung und erwogen eine direkte Erregung des Ventrikelmuskels als Ursache. Ähnliche Vaguslähmungen beobachteten sie nach hohen Dosen von Physostigmin.

ROTHBERGER u. WINTERBERG bestätigten diese Beobachtungen für Physostigmin und Muscarin am Warmblüter bei elektrokardiographischer Registrierung;

* Frau Prof. Dr. HEDWIG LANGECKER, Berlin, zum 60. Geburtstag gewidmet.

dabei beobachteten sie eine unter hochgradiger Vergiftung einsetzende ventrikuläre Automatie, die durch Vagusreize nicht zu hemmen war.

LOEWI fand, daß Pilocarpin in schwachen Dosen die Vaguserregbarkeit erhöhte und in hohen Dosen zu einer Vaguslähmung führte; die Erklärung durch Auftreten einer Kammerautomatie lehnte er für den Frosch ab. Er machte auf die Parallele zu den Erfolgen bei elektrischer Vagusreizung aufmerksam. Diese wird bei längerer Dauer unwirksam und kann einen folgenden Reizeffekt abschwächen. LOEWI nahm an, daß durch die Hemmung infolge der Vagusreizung die Funktion der reizbildenden Apparate in eine Intensitätssteigerung gerate, gewissermaßen als Gegenreaktion. Dadurch würden dann allmählich der elektrische Vagusreizeffekt und die Cholinwirkung abgeschwächt, eine Auffassung, die schon von HOUGH vertreten wurde. Im Sinne dieser Annahme beschrieb LOEWI, daß Choralhydrat und Urethan, die die Erregungslage der Herzautomatie dämpfen, den Vaguseffekt verstärkt erscheinen ließen.

In ähnlicher Weise erklärte GOTTLIEB Beobachtungen von ELLINGER, der eine Muscarinbradykardie am isolierten Kaninchenherzen durch Campher aufzuheben vermochte. Für eine positiv-chronotrope Campherwirkung haben sich auch FROELICH u. GROSSMANN ausgesprochen, die einen Strophanthinstillstand durch Campher aufhoben.

STROSS bestätigte für verschiedene ätherische Öle neben Campher eine Aufhebung des Herzstillstandes nach Vagusstammreizung. LANGECKER bestätigte in einer umfangreichen Arbeit, die sich zum großen Teil mit der Aufhebung pharmakologischer Herzstillstände durch Analeptika befaßt, die Intensivierung der Reizbildung durch Campher. Sie erklärt sie aber gerade als Folge des Ausfalles der normalen Zügelfunktion des Vagus auf die Reizbildung.

NAVRATIL beobachtete bei Vaguserregungen am Kaltblüterherzen, daß Campher in kleinen Konzentrationen die Erregbarkeit erhöhen konnte, in größeren herabsetzte. Trotz Hemmung des Vaguseffektes wurde aber Überträgerstoff gebildet, was durch Übertragung von Kanüleninhalt nachgewiesen wurde.

Wie NAVRATIL beim Campher beobachteten sowohl FRÉDÉRICQ wie LAMALLE mit schwachen Konzentrationen von Coffein am Warm- und Kaltblüter eine Steigerung des Vaguseffektes, mit größeren Konzentrationen eine Vaguslähmung. Sie schlossen, ebenso wie LANGECKER, die diese Beobachtungen bestätigte, auf eine Lähmung der Acceleransendigungen in niedriger Dosierung.

BARBOUR u. KLEIN beobachteten am Kaltblüter eine reversible Vaguslähmung durch Coffein und Adrenalin. Auch sie diskutierten eine Erregbarkeitssteigerung der Reizbildung des Herzens als Ursache für die Vagushemmung.

Im Rahmen einer kritischen Untersuchung über die pharmakologische Beeinflussung von herz-vaguswirksamen Giften hatte SCHLEYPEN schon Bedenken gegen die Anerkennung aller dieser Wirkungen als echte Vaguslähmungen erhoben, ferner hatte sich HOHENSEE (in unveröffentlichten Versuchen am Leipziger Pharmakologischen Institut) mit der Analyse einer „scheinbaren Vaguslähmung“ befaßt. Es war uns die Vermutung aufgekommen, daß vielleicht dadurch Zustandsänderungen in der Erregungslage der Reizbildungszentren oder in der Kontraktionsenergie des Muskels ausgelöst werden können, die durch die möglichen Vagusreizeffekte nicht mehr zu hemmen sind.

Diese Auffassung würde also anschließen an die oben zitierte Meinung von LOEWI und würde auch eine weitere Deutung der Abschwächung peripherer Vaguseffekte im Sinne der Potentialtheorie von GREMELS überflüssig machen. GREMELS

hatte nämlich die Auffassung vertreten, daß bei Erregung des Vaguszentrums durch Pharmaka infolge eines erhöhten Vagustonus im Erfolgsorgan laufend größere Acetylcholinmengen freigesetzt würden. Einen zusätzlichen Vagusreizeffekt könnte man daher nur bei stärkerer Reizauslösung erzielen, weil ja nun eine höhere Differenz der Acetylcholinkonzentration am Erfolgsorgan erforderlich sei. Unter Dämpfung des Vaguszentrums mittels Schlafmittel würde sich danach umgekehrt eine erhöhte Vagusempfindlichkeit einstellen können. Dies ist übrigens nur für einige Narkotica tatsächlich erwiesen, meist wird dagegen die Vagusreaktion durch Narkotica abgeschwächt (siehe oben).

Wenn eine solche „scheinbare Vaguserregung“ durch eine erhöhte Erregungslage im Automatie-Zentrum eventuell durch erhöhten Sympathicustonus bedingt ist, dann müßte sie sich durch andere narkotisch dämpfende Stoffe oder auch Sympathicolytika (die keine direkte Vaguswirkung besitzen) aufheben lassen.

Ein Hinweis auf das Mitspielen der Sympathicuserregung ist übrigens schon aus mancherlei Beobachtungen zu entnehmen: ROSENBLUETH u. SIMEONE vermochten durch gleichzeitige Reizung von Vagus und Accelerans am Warmblüter antagonistische Gleichgewichtsreaktionen zu erzielen, und CORI hob schwache Vaguswirkungen am Froschherzen durch Adrenalinzusatz auf, ließ sie aber durch Ergotaminzusatz wieder deutlich werden. Auch die Tatsache, daß bei längerer Vagusreizung am Froschherzen in situ die Herzhemmung nur einige Sekunden anhält („escape“), erklärt man bekanntlich aus der Mitreizung von Acceleransfasern im Vagusstamm, die der Herzhemmung entgegenwirken.

Wir nahmen die entwickelte Fragestellung auf unter Verwendung des in situ durchströmten Froschherzens (nach BÜLBRING), weil man hier genauer als am Warmblüter wirksame Konzentrationen von Pharmaka allein und im Antagonismus zeitunabhängig in ihrer Wirkung vergleichen kann.

I. Methodik.

Die Versuche wurden am vollinnervierten, perfundierten Froschherzen in situ mit elektrischer Reizung des zentralen Vaguskernegebietes in der Medulla angestellt.

Als Versuchstiere dienten in den Monaten Februar bis Juli 1952 Esculenten und Temporarien, die in ihrem Verhalten keine Unterschiede zeigten. Der Frosch wird zwischen Auge und Trommelfell dekapitiert, die Extremitäten entfernt und der Rumpf rücklings auf einem Brettchen befestigt. Das Herz wird freigelegt und der Herzbeutel nur durch einen Längsschnitt eröffnet; die Übergangsstellen auf die Aorten und das Sinusgebiet müssen sorgfältig geschont werden. Dann wird nach BÜLBRING perfundiert, wobei wir allerdings auf Messung des Minutenvolumens verzichteten und nur einen kleinen Längsschnitt in der Aorta vor der Gabelung anlegten. — Zu beiden Seiten der Medulla oblongata wird in den subarachnoidalen Raum eine Gabelelektrode aus Platindraht etwa 5–8 mm tief eingeführt. Gereizt wurde mit Rechteckstromstößen aus dem Gerät „Megatest“, bei einer Impulsdauer von 1–1,5 msec und einer Impulsfrequenz von 8/sec. Die Reizung erfolgte in Reizperioden von 90 sec (später auf 60 sec verkürzt) in Zwischenräumen von mindestens 2 min. Der Erfolg der Vagusreizung wurde durch Abstoppen von je 10 Systolen und Anlegen einer Frequenzkurve ermittelt. Bei richtiger Elektrodenlage muß auf einen maximalen Probereiz hin sofortiger und vollständiger Herz-

stillstand eintreten. — Die auf ihre Vaguswirksamkeit zu prüfenden Substanzen wurden in RINGER-Lösung aus MARIOTTESchen Flaschen mit geringer Einflußhöhe (1—2 cm) perfundiert.

II. Ergebnisse der Vorversuche mit variiertem Vagusreiz.

An nichtvorbehandelten Esculenten wurde die Abhängigkeit des Vaguseffektes von der Impulsdauer und Frequenz der Reizung geprüft. Dabei wurde besonders die Frage des „escape“, d. h. des spontanen Abklingens der hemmenden Vaguswirkung unter der Reizung beobachtet.

Bei der Reizung des peripheren Vagusstammes tritt durch Beimengung sympathischer Elemente das Phänomen des „Vagus“- oder „Sympathicus-Frosches“ in Erscheinung, indem je nach der vegetativen Tonuslage bei dem einen Individuum eine Hemmung, bei anderen eine Beschleunigung der Herzaktion auf Reizung hin eintritt. Demgegenüber ergibt die Vagusreizung vom Kerngebiet der Medulla aus, wie schon von LANGECKER, GASKELL u. a. beschrieben, stets eine eindeutige Vaguswirkung, was von uns ausnahmslos für Winter- und Sommerfrösche bestätigt werden konnte. Eine jahreszeitliche Änderung der Reizschwelle war nicht sicher aufzuzeigen, da diese sowieso infolge der niemals ganz gleichen Elektrodenlage von Präparat zu Präparat stark schwankte.

Je nachdem, wie tief die Elektroden an der Medulla entlang eingeführt wurden, änderte sich die Antwort des Herzens auf einen Reiz. Zuerst fiel die Kontraktion des Vorhofes aus, bei Tieferlegen der Elektroden wurde meist die Kraft der Kammersystolen beeinträchtigt, während der Sinusrhythmus und seine Frequenz noch unbeeinflusst bleiben konnten. Dabei wurde hin und wieder eine Anordnung erreicht, bei der der Sinus sichtbar weiterschlug, während Vorhof und Kammer stillstanden. Erst bei Erreichung einer bestimmten Tiefe durch die Elektroden spitzen trat volle Wirkung auf die Herzfrequenz auf. In mehreren Versuchen schien auch eine auftretende Kammerautomatie durch Verbesserung der Elektrodenlage aufhebbar zu sein.

Bei Reizungen durch das Frequenzspektrum hindurch mit $\frac{1}{2}$, 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 Imp/sec (bei 1,0—1,5 msec Impulsdauer und einer Reizstromstärke von 1—10 mA) ergab sich ein Wirkungsoptimum von etwa 8—10 Imp/sec bis zu 20 Imp/sec. Je höher über dieser Grenze die Reizfrequenzen lagen, umso größer war die escape-Neigung.

Die escape-Neigung war im Sommer bei hoher Raumtemperatur (24°) größer. Es erwies sich als notwendig, zwischen die im Anfang unserer Versuchsreihe 90 sec, später 60 sec dauernden Reizperioden Pausen von einigen Minuten einzuschieben. Bei vielen schnell aufeinander folgenden Reizperioden und erst recht bei Dauerreizung nahm der Erfolg der Vagusreizung ab. Nach einer Dauerreizung von 30 min konnte auch mit hohen Reizstärken kein Effekt mehr erzielt werden. Diese Erscheinung ließ sich auch durch Verringerung der Impulsdauer und Herabsetzung der Impulsfrequenzen nicht verhindern. Eine Dauerreizung ohne escape, wie sie von ROSENBLUETH und SIMEONE und ERDMANN und MERCKER bei niederen

Frequenzen am Vagusstamm beschrieben wird, konnte in unserer Anordnung am Kaltblüter nicht erzielt werden.

Durch Umpolen ließ sich häufig nach eingetretenem escape eine erneute stärkere Vaguswirkung erzielen; in vielen Fällen blieb aber das Umpolen ohne Wirkung.

III. Pharmakologische Beeinflussung der Vagusreizeffekte.

1. *Echte vaguswirksame Stoffe.*

Es mögen zunächst einige Beispiele gegeben werden für Wirkungen, die als direkt parasymphatische betrachtet werden können, darunter auch die einer Ganglienblockierung für intramurale Vagusganglien.

Atropin wirkt parasymphatikolytisch, indem es die Wirkung des Überträgerstoffes am Erfolgsorgan aufhebt.

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 10 Imp/sec — 1,5 msec — 10 mA, Ausgangsfrequenz 45. Frequenz unter Vagusreiz 0 = 100% Hemmung. Nach 10 min Atropin 10^{-7} war Frequenz 40; Frequenz unter Vagusreizung 48, also keine Hemmung.

3 gleichartige Versuche zeigten mit Atropin 10^{-7} eine volle Vaguslähmung, die reversibel war. Die leichte Acceleration unter der Vagusreizung kann vielleicht als Reizausbreitung auf sympathische Zentren gedeutet werden.

Prostigmin vermag durch Blockierung der Esterase parasymphatische Erregungen zu verstärken, weil der Überträgerstoff Acetylcholin nicht abgebaut wird. Diese Verstärkung ließ sich auch mit unseren Präparaten bestätigen. Konzentrationen von 10^{-6} verhinderten vollständig jeden escape und erhöhten die Vaguswirkung, wenn unter der Probereizung mit niedrigen Reizstärken nur eine mäßige Frequenzverminderung erzielt worden war.

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 20 Imp/sec — 1,5 msec — 5 mA. Ausgangsfrequenz 55. Frequenzsenkung unter Vagusreiz 9%. Prostigmin 10^{-6} wurde 60 min lang perfundiert und verminderte die Frequenz auf 24. Unter RINGER war die Frequenz wieder 26, der Vaguseffekt noch 100%ig. Volle Reversibilität wurde in der Versuchszeit nicht erzielt, weil die Prostigminbindung an die Esterase schlecht gelöst wird.

Tetramon zeigte an 3 Präparaten mit 10^{-6} eine volle Aufhebung des Vagusreizeffektes. Im Gegensatz zu Atropin erfolgte aber bei aufgehobenem Vaguseffekt unter der Reizung keine Acceleration. Niedrigere Konzentrationen als 10^{-6} lösten mindestens eine verstärkte escape-Neigung aus.

Interessanterweise zeigte Tetramon in dieser Versuchsanordnung einen wechselseitigen Antagonismus mit Prostigmin. Tetramon 10^{-5} hob einen Prostigmineffekt auf, so daß der Vagusreiz wieder abgeschwächt wurde. Umgekehrt wurde eine Tetramonlähmung des Vagus durch Prostigminperfusion aufgehoben.

Versuchsbeispiel mit Reizbedingungen: 20 Imp/sec — 1,5 msec — 7 mA.
 Ausgangsfrequenz 67, Frequenz sinkt unter Vagusreiz auf 0 = 100%.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
Tetramon 10^{-7}	10	34	3	100
10^{-6}	15	35	0 dann escape	(100)
10^{-5}	15	39	39	0

Acetylcholin wurde auch in einigen Versuchen geprüft. Konzentrationen von 5×10^{-9} bis 10^{-7} lösten eine deutliche Bradykardie aus und verstärkten schwache Vagusreizeffekte bei gleichbleibenden Reizbedingungen. Es addierte sich also die Wirkung des Überträgerstoffes und des perfundierten Acetylcholins.

2. Herzleistungsfördernde Stoffe.

Adrenalin wirkt als sympathischer Erregungsstoff positiv chronotrop und inotrop. In Konzentrationen 10^{-7} bis 10^{-6} (meist 3×10^{-7}) wurde die Vaguswirkung deutlich herabgesetzt (15 Versuchspräparate). Das wurde auch erreicht, wenn Adrenalin die normale Herzfrequenz nicht zusätzlich steigerte, wie es z. B. im Sommer meist der Fall war. Ferner war eine verstärkte escape-Neigung zu beobachten. So konnte gelegentlich unter Adrenalin bei gleicher Reizstromstärke wie vorher noch ein kurzer Stillstand hervorgerufen werden, aber bald trat escape ein. Durch höhere Reizstromstärke konnte wieder ein kurzer Stillstand erzielt werden, der bald wieder von escape abgelöst wurde. Das konnte mit immer höheren Reizstromstärken mehrfach wiederholt werden. — Die vagushemmende Wirkung des Adrenalins war durch RINGERperfusion schnell reversibel.

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 10 mA.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	74	0	100
Adrenalin 3×10^{-7} . .	5	75	52	31
RINGER	5	74	0	100

Purinkörper haben in höheren Konzentrationen fördernde Wirkung auf die Kontraktionsleistung des Froschherzens, die über die glatte Muskulatur ausgelöst wird (vgl. I. SCHULZE).

Coffein zeigte in Konzentrationen ab 10^{-3} eine sichere Abschwächung des Vaguseffektes; gleiches Verhalten ergaben Theophyllin 10^{-3} und Theobromin 5×10^{-4} . Auch diese Wirkungen waren reversibel. Frequenzerhöhungen wurden bei diesen Pharmaka nicht beobachtet. Niedrigere Konzentrationen hoben den Vaguseffekt nicht auf.

*Versuchsbeispiel für Theophyllin bei Reizbedingungen:
20 Imp/sec — 1,5 msec — 5 mA.*

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	30	0	100
Theophyllin 10^{-4} . . .	8	30	2	93
	15	28	0 dann escape 23	(100) 5
RINGER	25	19	0	100
Theophyllin 10^{-3} . . .	12	27	27	0

Campher hat nur in gewissen Konzentrationsbereichen eine herzfördernde Wirkung, die freilich bei der praktischen Verwendung neben der indirekten Kreislaufbesserung durch Erhöhung des Vasomotorentonus keine besondere Rolle spielt. Dem *Campher* wird, wie einleitend erwähnt wurde, eine Vaguslähmung zugeschrieben. In unseren Versuchen bewirkte Borneol-Campher auch eine völlige Aufhebung der Vagusreizwirkung, die auch bei Erhöhung der Reizstromstärke nicht wiederkehrte. Die Spontanfrequenz des Herzens war dabei schon herabgesetzt. Es lag also keineswegs eine Herzförderung vor. Überraschenderweise war der Camphereffekt auch bei längerer RINGERSpülung nicht reversibel in den möglichen Beobachtungszeiten.¹ Die Campherwirkungen begannen ab 10^{-5} (5 Versuchspräparate).

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 10 mA.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	46	26	43
Campher 2×10^{-5} . .	5	38	32	15
	15	30	25	17
Campher 10^{-4}	10	18	17	5
	3	17	17	0

3. Herzlähmende Stoffe.

Hier wurden einige Stoffe ausgewählt, denen vorwiegend eine Dämpfung der Reizbildung in den Automatiezentren zugeschrieben werden kann, nämlich 2 verschiedenartige Narkotica und Chinin. Dabei ist aber zu beachten, daß Barbitursäurepräparate nach Erfahrungen von ERDMANN und MERCKER auch die intramuralen Ganglien des Vagus hemmen

¹ Neue Kontrollversuche bestätigten inzwischen die Vagusausschaltung mit Campherkonzentrationen ab 10^{-5} . Diese Wirkung war aber mit RINGERperfusion reversibel. In den früheren Versuchen war die aus dem Aortenbogen ausfließende Lösung nicht zur Messung der Förderleistung abgeleitet worden und hatte Gelegenheit, auch den Vagusstamm in der Umgebung des Herzens zu bespülen. Diese Wirkung hat sich offensichtlich schlecht auswaschen lassen.

können und daß Chinin dies ebenso vermag (ERDMANN, unveröffentlichte Versuche), wie es auch KEWITZ und REINERT für Chinin am sympathischen Cervikal-Ganglion gezeigt hatten.

Urethan erwies sich als unwirksam auf den Vagusreiz, selbst in Konzentrationen bis 10^{-2} , die schon eine starke Verlangsamung der Spontanzfrequenz bewirkten (10 Versuchspräparate).

Evipan-Natrium hatte in Konzentrationen von 10^{-4} keinen Einfluß auf die spontane Rhythmik, schwächte aber die Vagusreizung bis zur vollen Aufhebung ab. Die Wirkung war in 10—20 min einer RINGERSpülung nicht reversibel (4 Versuchspräparate).

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 2 mA.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	54	25	45
Evipan 10^{-4}	10	59	58	2
RINGER	15	46	46	0

Chinin-Konzentrationen von 3×10^{-7} und weniger zeigten keine Wirkung auf den Vaguseffekt. Ab 10^{-6} wurde der Reizeffekt zunehmend abgeschwächt und bei 10^{-5} völlig aufgehoben. Die Wirkung war leicht reversibel bei RINGERperfusion (Versuche an 5 Versuchspräparaten).

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 10 mA — 60 sec.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	41	0	100
Chinin 10^{-5}	6	45	43	3
Chinin 3×10^{-7}	10	42	0	100

4. Adrenalin in antagonistischer Kombination.

Da Adrenalin ohne bekannte spezifische Vaguswirkung den Vaguseffekt zuverlässig abzuschwächen vermochte, konnte man versuchen, in Kombination mit anderen, z. B. lähmenden Stoffen, den Vaguseffekt wieder herzustellen. Dann konnte ein solcher eventueller Antagonismus mit wiederum nicht selbst vaguswirksamen Stoffen vielleicht erklären, wie der Adrenalineffekt gegen Vagusreizwirkung zustande kommt.

a) *Kombination mit Urethan.* Urethan 10^{-2} , welches sich selbst als nichtvaguswirksam erwiesen hatte, vermochte keine Aufhebung der Vaguswirkung des Adrenalins, aber auch nicht von Coffein und Campher hervorzurufen. Höhere Urethan-Konzentrationen von 2×10^{-2} führten allein schon zum Herzstillstand. Bei gleichzeitiger Einwirkung von Adrenalin in vagushemmenden Konzentrationen kam es zu starken Unregelmäßigkeiten der Herzaktion, Blocks, wurmförmigen Kontraktionen

und Wühlen, die ein Experimentieren mit Vagusreizung unmöglich machten. Ähnliche Bilder wurden auch bei gleichzeitiger Einwirkung von Urethan und Campher beobachtet (10 Versuchspräparate).

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 3 mA.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	51	0	100
Adrenalin 10^{-6}	20	55	30	45
Adrenalin und Urethan 10^{-2}	15	40	32	20

b) *Kombination mit Chinin.* Chinin-Konzentrationen ohne eigene Vaguswirkung (3×10^{-7}) hatten auf die den Vagus abschwächende Adrenalinwirkung keinen Einfluß. Höhere Konzentrationen (10^{-6}) verstärkten additiv die hemmende Wirkung von Adrenalin auf die Vagusreizwirkung.

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 1,5 mA — 60 sec.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	40	0 geringes escape	100
Adrenalin $2,5 \times 10^{-7}$	3	46	30	34
Adrenalin und Chinin 3×10^{-7}	7	41	23	43
	5	41	28	35
RINGER	10	38	0 geringes escape	100
Adrenalin $2,5 \times 10^{-7}$	7	43	31	27
und Chinin 10^{-6}	3	44	33	24

c) *Kombination mit Dihydroergotamin (DHE).* In einer Konzentration 10^{-5} perfundiert senkte die Substanz die Spontanfrequenz und ließ eine unter Adrenalin abgeschwächte Vaguswirkung wieder voll hervortreten (5 Versuchspräparate).

Versuchsbeispiel bei Reizbedingungen: 8 Imp/sec — 0,5 msec — 3 mA.

Konzentration	Dauer in min	Frequenz vorher	Frequenz unter Vagusreiz	Hemmung in %
RINGER	—	53	0	100
Adrenalin $2,5 \times 10^{-7}$	11	56	41	27
DHE 10^{-5} und Adrenalin $2,5 \times 10^{-7}$	14	46	0 (2 mA)	100
	5	43	0 (2 mA)	100

IV. Erörterung der Befunde.

Das von uns verwendete Verfahren weist gegenüber den Beobachtungen bei Prüfung der Vagusreizeffekte am intakten Warmblüter gewisse Unterschiede auf, die auch einige abweichende Ergebnisse verständlich machen können. Zunächst ist zu sagen, daß bei unseren Verfahren das geprüfte Gift lediglich das periphere Erfolgsorgan und nicht gleichzeitig das Vaguszentrum treffen konnte, so daß also nur Änderungen der Empfindlichkeit des Erfolgsorgans zum Ausdruck gelangten. Da das Zentralnervensystem, insbesondere das Gebiet der experimentellen Reizauslösung, ohne Kreislauf war, also einem Sauerstoffmangel unterlag, ist es verständlich, daß die Lebensdauer des Präparates begrenzt war. Immerhin waren die Vagusreize 60—90 min voll wirksam, nahmen dann aber schnell ab. Wir stellten daher auch nur kurzfristige Versuche an. Dies war aber auch möglich, weil die direkte Durchströmung mit konstanten Konzentrationen ja sofort eine Einstellung auf maximale Wirkung (ohne Resorption und Verteilung) ermöglichte.

Für die Form der Reizung beschränkten wir uns auf kurze Stromserien (60—90 sec Dauer). Das von ROSENBLUETH und SIMEONE sowie neuerdings von ERDMANN und MERCKER mit Erfolg verwendete Verfahren des Vagusdauerreizes bei geeigneter Frequenz war nicht brauchbar, weil sich hier keine so konstante Pulsfrequenz als Folge einer gleichmäßigen Reizreaktion einstellte. Möglicherweise ist der Kaltblüterstoffwechsel zu träge, um so lang anhaltende Reaktionen im Nervensystem zu sichern; das mag insbesondere für die schlechte O₂-Versorgung des Vaguskernegebietes gelten (siehe oben).

Im Hinblick auf das Abklingen der Vagusreaktion bei fortlaufender Reizung (escape) konnte wir zwar die Erfahrungen von ERDMANN und MERCKER bestätigen, daß diese escape-Neigung bei frequenter Reizung größer als bei niedriger Frequenz (weniger als 10 Imp/sec) ist. Wir fanden aber auch bei niedriger Frequenz einen escape, besonders dann, wenn durch niedere Konzentrationen erregender Gifte die Ansprechbarkeit des Vagus schon gedämpft wurde.

Zur Deutung dieses escape-Effektes haben wir über die von ERDMANN und MERCKER diskutierten Möglichkeiten hinaus keine neuen Punkte zur Erwägung stellen können. Auch bei unseren Versuchen spielten gelegentlich Polarisationsvorgänge an der Reizstelle eine Rolle, da auf Umpolen bei escape gelegentlich eine erneute Vaguswirkung eintrat. Manchmal spielte auch eine hererotope Reizbildung eine Rolle. Wenn niedere Kammerfrequenzen ohne Sinustätigkeit eintraten, konnte bei einer veränderten Elektrodenlage doch wieder ein Stillstand durch Vagusreize ausgelöst werden. Selten einmal wurde unter Vagusreiz ein Nachschlagen des Vorhofs beobachtet.

Bei unseren Beobachtungen mit den Pharmaka Acetylcholin oder Prostigmin ergab sich ein additives Verhalten des vorhandenen Überträgerstoffes mit dem bei der Reizung gebildeten, also keineswegs eine Abschwächung, wie man es nach der Potentialtheorie im Sinne von GREMELS zu erwarten hätte.

Die Abschwächung bzw. Aufhebung des Vagusreizeffektes durch Adrenalinperfusion braucht nicht im Sinne einer „Vaguslähmung“ gedeutet zu werden, sondern ist ein typisches Beispiel dafür, daß die höhere Erregungslage der Automatiezentren bzw. die verstärkte Kontraktionskraft des Muskels zur Hemmung eine größere Dosis von Acetylcholin benötigt. Da nun nach den Reizgesetzen des Nervensystems bei maximaler Reizung aller Fasern nach dem „Alles-oder-Nichts-Gesetz“ nur eine optimale Menge von Acetylcholin freigesetzt werden kann, ist es verständlich, daß bei stärkerer Reizbildung unter Adrenalin diese Menge vielleicht nicht mehr ausreicht. Für diese Deutung spricht z. B. die Erfahrung, daß man bei Erhöhung der Acetylcholin dosierung am peripheren Organ Adrenalin-stimulierte Herzen doch noch hemmen kann.

Solche „scheinbaren Vaguslähmungen“ wären sinngemäß auch für andere erregende Stoffe der Herztätigkeit zu erwarten, und man müßte umgekehrt annehmen, daß durch lähmende Stoffe für die Reizbildung auch wieder (ohne daß diese narkotischen Stoffe selbst Vagusreizgifte wären) die „scheinbare Vaguslähmung“ aufgehoben würde. Gerade aus diesem Grunde hatten wir auch einige narkotische Stoffe in unsere Versuche einbezogen. Unsere Vermutung ließ sich leider bisher nicht so eindeutig beweisen, wie wir es erwartet hatten. Für das Coffein und andere Purinderivate beobachteten wir eine Abschwächung oder Aufhebung des Vaguseffektes, den wir in unserem Sinne nur eine scheinbare Vaguslähmung nennen möchten, weil die Purinkörper die Kontraktionskraft des Herzmuskels erhöhen, wenn sie auch nicht, wie Adrenalin, die Automatie der Reizbildung fördern. Dagegen gelang es nicht mit Urethan in Konzentrationen, die selbst schon die Erregungs- und Kontraktionsbedingungen des Herzens herabsetzten, den Vagusreizeffekt zu erhöhen, bzw. die „Vaguslähmung“ nach Coffein oder auch Adrenalin aufzuheben. Das Evipan eignete sich nicht für diese antagonistische Versuche, weil es schon selbst den Vaguseffekt abschwächte, vermutlich über eine Lähmung der intramuskulären parasymphatischen Ganglien.

Ein besonderes Problem bot der *Campher*. Die deutliche Senkung der Vaguserregbarkeit nach Campher war durch narkotische Stoffe nicht aufzuheben. Man kann also, zumal der Campher die Reizbildung und Kontraktionsleistung in den gewählten Konzentrationen schon selbst herabsetzte, die Campherwirkung am Froschherzen nicht recht im Sinne einer „scheinbaren Vaguslähmung“ durch Erhöhung der Erregungslage deuten, wie es z. B. LOEWI und ELLINGER nach Warmblüterversuchen

annahmen (vgl. Einleitung). Man muß daher wohl die Auffassung erwägen, daß Campher vielleicht auch die intramularen Ganglien lähmt, wie z. B. Tetraäthylammoniumbromid oder Nicotin.

In die gleiche Gruppe der Ganglienblocker wird man vielleicht auch das *Chinin* einzureihen haben, für das wir auch eine Aufhebung der Vagusreaktion und im antagonistischen Versuch keine Beseitigung der scheinbaren Vaguslähmung des Adrenalins beobachten konnten. Chinin gilt als Lähmer für Reizbildung und Kontraktionskraft des Herz-Muskels. Man hätte also eher eine Förderung der hemmenden Vaguswirkung erwarten dürfen. Die Vagusausschaltung durch Chinin beobachteten wir mit Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} . Solche Konzentrationen dürften bei der üblichen hohen Dosierung von Chinin und besonders des wirksameren Chinidins, das wir hier nicht prüften, in Fällen von klinischer Verwendung bei schweren Herzirregularitäten erreicht werden. Dann könnte man aber vermuten, daß die flimmerwidrige Wirkung hoher Gaben von Chinin und Chinidin nicht allein auf der Beeinflussung von den genannten Elementarqualitäten des Herzmuskels beruht, sondern auch auf einer Ausschaltung des die Flimmerneigung unterstützenden Vagustonus. Eine antagonistische Wirkung des Chinidins gegenüber dem Acetylcholin haben am Froschherzen WENDHUT und LENDLE schon in diesem Sinne experimentell früher nachgewiesen.

Zusammenfassung.

Der Erfolg der hemmenden Vagusreizung wurde auf das in situ mit verschiedenen Pharmaka durchströmte Froschherz geprüft.

Die Vagusreizung erfolgte mit Stromstößen, die nach Frequenz und Stärke sowie Dauer gestuft waren, vom Vaguskernegebiet aus. Bei fortlaufender Reizung zeigte sich auch im Bereich niedriger Frequenzen ein Abklingen der Vagusreaktion (escape).

Die periphere Acetylcholin- und Prostigminwirkung addierte sich mit dem Vagusreizeffekt. Herzfördernde Stoffe (Adrenalin, Purinkörper) schwächten die Vagusreize im Sinne einer „scheinbaren Vaguslähmung“ ab. Narkotica (Urethan und Evipan) mit dämpfender Wirkung für die Automatie verstärkten nicht den hemmenden Vaguseffekt. Evipan hob die Vagusreizwirkung vermutlich über eine Ausschaltung der intramuralen Ganglien auf. Urethan wirkte nicht antagonistisch zu den herzfördernden Stoffen im Sinne einer Vagusverstärkung.

Die Vaguslähmung nach Campher konnte nicht über eine Erhöhung der Erregungslage der Herztätigkeit erklärt werden und beruht vielleicht ähnlich wie die des Chinins auf einer Lähmung der Vagusganglien.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Überlassung des in der Arbeit verwendeten Reizgerätes „Megatest“.

Literatur.

BARBOUR, H. S., u. S. KLEIN: J. of Pharmacol. **7**, 541 (1915). — BÜLBRING, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **152**, 257 (1930). — CORI, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **91**, 130 (1921). — ERDMANN, W. D., u. H. MERCKER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **216**, 563 (1952). — FRÉDÉRICQ, H.: Arch. internat. Physiol. **13**, 115 (1913). — FROEHLICH, A., u. M. GROSSMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **82**, 177 (1917). — GASKELL, W. H.: J. of Physiol. **7**, 49 (1880). — GOTTLIEB, R.: Hefft. Hdb. d. exper. Pharmacol. I, **1**, 1183 (1923). — GREMELS, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **179**, 360 (1935). — HARNACK, E., u. L. WITKOWSKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **5**, 401 (1876). — HOUGH, TH.: J. of Physiol. **18**, 161 (1895). — KEWITZ, H., u. H. REINERT: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 547 (1952). — LAMALLE, A.: zit. nach Ber. Physiol. **127**, 419 (1942). — LANGECKER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **106**, 1 (1925). — LOEWI, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **70**, 351 (1912). — NAVRATIL, E.: Pflügers Arch. **210**, 550 (1926). — ROSENBLUETH, A., u. F. A. SIMEONE: Amer. J. Physiol. **110**, 42 (1934). — ROTHBERGER, C. J., u. H. WINTERBERG: Pflügers Arch. **132**, 233 (1910). — SCHLEYPEN, W.: In. Diss. Münster/Westf. 1934. — SCHMIEDEBERG, O.: Ber. Kgl. sächs. Wiss. **22**, 130 (1870); vgl. W. HEUBNER, Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **204**, 33 (1947). — SCHULZE, I.: In. Diss. Göttingen 1953. — STROSS, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **95**, 304 (1922). — WENDHUT, G., u. L. LENDLE: Z. exper. Med. **118**, 91 (1951).

Prof. Dr. L. LENDLE, Pharmakol. Inst. d. Univ. Göttingen, Geiststraße 9.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Schmerzauslösung, Entzündungserregung und Wirkung auf die Capillaren bei Benzo- und Naphthochinonen und die Beziehung dieser Erscheinungen zur Hemmung der Dehydrasen des aeroben Kohlenhydratabbaus.

Von

ALBERT HERZ.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. August 1953.)

Die primäre Bedeutung einer Fermentstörung für den Entzündungsvorgang tritt immer mehr in den Vordergrund: durch Hemmung des oxydativen Stoffwechsels kann die zur Strukturbewahrung der Zelle erforderliche Energie nicht mehr nachgeliefert werden und es kommt zu Zerfall des Zellgefüges (RIESSER). Der beim Kohlenhydratstoffwechsel freiwerdenden Energie kommt dabei besondere Bedeutung zu.

Für einen Zusammenhang von Entzündung und Störung des Kohlenhydratstoffwechsels spricht eine größere Zahl von Befunden. Beim Allylformiat, dem charakteristischen Entzündungsgift EPPINGERS, konnte FLECKENSTEIN (1944) zeigen, daß die durch dieses Gift hervorgerufene Atmungshemmung Folge einer direkten Wirkung auf die Parenchymzellen ist. Substanzen, die den Kohlenhydratabbau zu stützen vermögen, wie Nicotinsäure (BEIGLBÖCK und BERTSCHINGER) und Lactoflavin (ALBERICH und BEIGLBÖCK) wirken der Allylformiatvergiftung entgegen. Bei den Vesikantien, deren Wirkungsmechanismus besonders in den angelsächsischen Ländern intensiv studiert worden ist, scheint ebenfalls die primäre Störung des Kohlenhydratabbaus wesentlich für das pathologische Geschehen zu sein (Übersicht bei DANIELLI). BACQ brachte die schmerz- und tränenerregende Wirkung verschiedener halogenhaltiger Körper mit ihrer Fähigkeit, die Glykolyse zu hemmen, in Verbindung. FLECKENSTEIN (1950) konnte jedoch zeigen, daß durch solche Reizstoffe die anaerobe Phase des Kohlenhydratstoffwechsels in geringerem Maße als die aerobe in Mitleidenschaft gezogen wird, und hier wiederum die Hemmung der dehydrierenden Fermente im Vordergrund steht. HAAS fand bei Substanzen mit lokaler Reizwirkung daß — mit Ausnahme der Crotonsäure — die Atmung der Leber bereits durch Giftkonzentrationen gehemmt wird, die die Glykolyse noch nicht beeinträchtigen oder auch steigern. KÖHLER und SCHARF konnten für die Entzündung eine antagonistische Wirkung von Atmungs- und Glykolysehemmung nachweisen: durch Monojodessigsäure erfahren Entzündungen, auch solche, die durch Atmungsgifte hervorgerufen sind, eine Abschwächung.

Die schmerzerregende Wirkung chemischer Substanzen brachte erstmals FLURY mit der Hemmung fermentativer Prozesse des Zellstoffwechsels in Verbindung. FLECKENSTEIN (1950) zeigte sodann, daß durch solche Schmerzstoffe vorwiegend die Atmung, und hier wiederum die Dehydrasen gehemmt werden. Die Verminderung der Zelloxydationen führt nach seinen Vorstellungen zur Depolarisation der schmerzvermittelnden Nervenendigungen und damit zu Schmerzauslösung.

Während FLECKENSTEIN versuchte, unter fermentchemischen Gesichtspunkten die vielfältigen Erscheinungen lokaler Reizwirkung einheitlich zu erklären, zeigten die Untersuchungen HEUBNERS (1925) über Reizstoffe, daß beinahe jede einzelne dieser Substanzen einen eigenen Charakter der Wirkung aufweist. HEUBNER (1950) warnt vor Verallgemeinerungen auch in einer neuen Schrift, in der er sich mit den Forschungsergebnissen der jüngsten Zeit und deren Deutung auseinandersetzt.

In vorausgegangenen eigenen Untersuchungen (HERZ) konnte gezeigt werden, daß dehydrierende Fermente des aeroben Kohlenhydratabbaus durch Benzo- und Naphthochinone mehr oder weniger stark gehemmt werden. Die weitere Prüfung ergab, daß diese Substanzen bei intracutaner Injektion Schmerz erzeugen, an den Schleimhäuten Entzündungserscheinungen hervorrufen und die Capillaren erweitern. Im Zusammenhang mit den oben angeschnittenen Fragen lokaler Reizwirkung war es von Interesse, diese verschiedenen Wirkungen quantitativ zu erfassen und mit der Hemmung der Dehydrasen in Beziehung zu setzen.

Für die Untersuchungen standen die in Tab. 1 aufgeführten Substanzen zur Verfügung¹.

Wäßrige Lösungen der Substanzen wurden jeweils unmittelbar vor dem Versuch frisch bereitet, bei den schwer wasserlöslichen mit Hilfe von 1,2-Propylen-glykol. Eine Beeinflussung der Reaktionen durch das Lösungsmittel in der angewandten Konzentration (maximal 4%) wurde jeweils ausgeschlossen.

1. Schmerzerregung.

Die Schmerzwirksamkeit der verschiedenen Substanzen wurde im Selbstversuch durch intracutane Injektion an der Innenseite des Unterarmes geprüft.

Mit feiner Nadel wurde flach eingestochen und mit der Injektion zunächst gewartet, bis der Reiz des Einstichs abgeklungen war, sodann wurden 0,05—0,1 cm³ der in 0,85% iger Kochsalzlösung gelösten Substanzen innerhalb von etwa 4 sec injiziert. Um jede suggestive Beeinflussung bei der Beurteilung der Schmerzqualitäten auszuschalten, waren die jeweiligen Substanzen und deren Konzentration nur einer Hilfsperson bekannt. Die Versuchsprotokolle wurden nach Abschluß einer Versuchsserie durch die Angabe der entsprechenden Substanz und Konzentration ergänzt. Die Schmerzempfindungen bei ein und derselben Lösung schwankten von Injektion zu Injektion nur mäßig.

Die folgende Aufstellung gibt die Mittelwerte der Schwellenkonzentrationen bei den verschiedenen Substanzen wieder; diese Schwellenwerte lösten eine von der Kochsalzinjektion sicher unterscheidbare

¹ Bei p-Benzochinon handelt es sich um ein Präparat der Firma Merck, Darmstadt; 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon wurde von der Firma Zyma-Blaes, München aus *Drosera rotundifolia* isoliert; Toluchinon und p-Xylochinon wurden vom Chemischen Staatslaboratorium München, 2,3-Dioxy-naphthochinon von Herrn Professor KUHN, Heidelberg, die übrigen Substanzen von der Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach, zur Verfügung gestellt. Auch an dieser Stelle sei dafür gedankt.

Schmerzreaktion aus. Sie stellen den Durchschnittswert aus mindestens fünf, zum Teil erheblich mehr Injektionen dar. Die Substanzen sind nach abnehmender Wirksamkeit geordnet.

Tabelle 1. *Schwellenwerte der Schmerzwirksamkeit.*

Substanz	Molare Konzentration
1 α -Naphthochinon	$6,6 \cdot 10^{-6}$
2 Toluchinon	$1,5 \cdot 10^{-5}$
3 p-Benzochinon	$2 \cdot 10^{-5}$
4 p-Xylochinon	$2 \cdot 10^{-5}$
5 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon .	$2,5 \cdot 10^{-5}$
6 2-Methyl-naphthochinon	$4 \cdot 10^{-5}$
7 2,6-Dimethyl-naphthochinon . .	$7,5 \cdot 10^{-5}$
8 2,3-Dioxy-naphthochinon	$1 \cdot 10^{-4}$
9 2-Methyl-3-oxy-naphthochinon .	$2 \cdot 10^{-4}$
10 2,3-Dimethyl-naphthochinon . .	$5 \cdot 10^{-4}$ noch keine sichere Schmerzempfindung.

Bei den meisten Substanzen setzte der Schmerz, auch bei den kleinsten, noch eben wirksamen Konzentrationen, fast unmittelbar nach Beginn der Injektion ein, währte bei dieser Schwellenkonzentration eine Reihe von Sekunden, um dann meist ziemlich schnell abzuklingen. Der Schmerz war hell, manchmal fast stechend oder auch brennend und gut lokalisierbar. Im Gegensatz zu diesen fast unmittelbar mit Beginn der Injektion einsetzenden schmerzhaften Sensationen durch die meisten der geprüften Substanzen fiel bei 2-Methyl-naphthochinon und besonders bei 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon und 2,6-Dimethyl-naphthochinon auf, daß die Injektion selbst mehr oder weniger schmerzlos verlief und auch noch nach der Injektion 5—20 sec lang nur angedeuteter Schmerz vorhanden war, der erst dann zu voller Stärke anschwell, um nach etwa 30—40 sec wieder allmählich abzuklingen. Mitunter war während der Injektion und unmittelbar danach nur ein unbestimmtes, dumpfes Gefühl wahrzunehmen, das erst allmählich in eigentlichen Schmerz überging. Bei über dem Schwellenwert gelegenen Konzentrationen war eine solche Latenzperiode gewöhnlich kürzer, doch meist noch recht deutlich erkennbar. Bei sehr hohen Giftkonzentrationen dagegen war eine solche verzögerte Schmerzempfindung nicht mehr sicher wahrnehmbar. Eine gewisse Latenzperiode war auch bei p-Xylochinon angedeutet.

Mit einer Erhöhung der Giftkonzentration auf das Mehrfache der schmerzwirksamen Schwellenwerte wuchs die Stärke und die Dauer des Schmerzes beträchtlich. So löste die fünfzehnfache Schwellenkonzentration von α -Naphthochinon ($M 1 \cdot 10^{-4}$) einen zunächst fast unerträglichen, hellen, stechenden Schmerz aus, der einige Minuten währte, dann in seiner Intensität etwa nachließ, nach etwa einer halben Stunde

an Stärke eher wieder zunahm und dann einen mehr dumpfen, unbestimmten Charakter hatte.

2. Entzündungserregung.

Die entzündungserregende Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen wurde zunächst am Kaninchenauge untersucht.

Da die Konzentrationen der Giftlösungen bei der schlechten Wasserlöslichkeit der meisten Substanzen nicht beliebig erhöht werden konnten, war es notwendig, um wenigstens bei den stärker wirksamen Körpern stärkere Entzündungszeichen hervorzurufen, die Lösungen relativ lange auf die Bindehäute einwirken zu lassen. Die in physiologische Kochsalzlösung gebrachten Substanzen wurden fünf mal für die Dauer von je 1 min im Abstand von 5 min in das Auge gebracht. Dabei wurde der Kopf des Tieres zur Seite gedreht und die Lider gespreizt, so daß Giftlösungen ausgiebig auf Hornhaut und Bindehäute einwirken konnten. An den beiden Augen desselben Tieres wurden jeweils verschiedene Substanzen miteinander verglichen. Über das Ausmaß der in den folgenden Stunden und Tagen einsetzenden entzündlichen Reaktion wurden Aufzeichnungen gemacht. Die folgende Aufstellung gibt die bei 48 Einzelversuchen gewonnenen Ergebnisse wieder. Die Substanzen sind nach abnehmender Wirksamkeit geordnet.

Tabelle 2. Entzündungserregende Wirksamkeit am Kaninchenauge.

Substanz	Molare Konzentration	Konjunktivale Injektion	Schleimsekretion	Chemosis	Hornhauttrübung
1 α -Naphthochinon. . .	$2 \cdot 10^{-3}$	+++	++++	++++	++
	$1 \cdot 10^{-3}$	+++	+++	+++	+
2 Toluchinon	$4 \cdot 10^{-3}$	++	++	+++	+
	$1 \cdot 10^{-3}$	++	++	++	Ø
3 p-Benzochinon	$4 \cdot 10^{-3}$	++	++	+++	(+)
	$1 \cdot 10^{-3}$	+	+	++	Ø
4 p-Xylochinon	$4 \cdot 10^{-3}$	++	+	+++	(+)
	$1 \cdot 10^{-3}$	+	+	+	Ø
5 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon. . .	$1 \cdot 10^{-3}$	++	+	+	(+)
6 2-Methylnaphthochinon . . .	$2 \cdot 10^{-3}$	+	+	+	(+)
	$1 \cdot 10^{-3}$	(+)	(+)	(+)	Ø
7 2,6-Dimethylnaphthochinon . . .	$5 \cdot 10^{-4}$	(+)	Ø	(+)	Ø
8 2,3-Dioxy-naphthochinon . . .	$1 \cdot 10^{-3}$	Ø	Ø	Ø	Ø
9 2,3-Dimethylnaphthochinon . . .	$5 \cdot 10^{-4}$	Ø	Ø	Ø	Ø
10 2-Methyl-3-oxy-naphthochinon . . .	$1 \cdot 10^{-3}$	Ø	Ø	Ø	Ø

Die Fähigkeit, entzündliche Reaktionen auszulösen, wurde in weiteren Versuchen durch intracutane Injektion am Rücken von Kaninchengeprüft.

Nach Enthaarung mit Bariumsulfid und Abklingen der dadurch bewirkten Reizung wurden die Substanzen — meist in 1/1000 molarer Konzentration — intracutan injiziert und die in den folgenden Stunden und Tagen einsetzende Reaktion beobachtet. Wegen der großen Schmerzhaftigkeit der Injektionen waren die Tiere dabei leicht narkotisiert (Urethan).

Bei den stark wirksamen Substanzen kam es zur Ausbildung einer umschriebenen, ziemlich derben Infiltration, die nach einigen Tagen, ohne Einschmelzungserscheinungen zu zeigen, sich wieder zurückbildete. Nur vereinzelt und unregelmäßig kam es zur Ausbildung kleiner Blasen. Bei 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon und α -Naphthochinon waren meist kleine Blutungen zu beobachten. Die Reihenfolge der Substanzen, geordnet nach abnehmender Stärke der Entzündungserscheinungen, war etwa die gleiche wie die am Kaninchenaugen festgestellte.

3. Wirkung auf die Capillaren.

Bei der Prüfung der Wirkung auf die Capillaren erwies sich die Froschzunge als geeignetes Studienobjekt.

Zur Verwendung kamen kleine bis mittelgroße Eskulenten, die mit Urethan narkotisiert wurden. Nach Eintreten des erforderlichen, ziemlich tiefen Narkosegrades (zur Ausschaltung reflektorischer Zungenbewegungen) wurde das Tier auf einer dünnen Korkplatte derart gelagert, daß die herausgestülpte Zunge über eine ausgestanzte runde Öffnung von etwa 1,5 cm Durchmesser zu liegen kam. Die Ränder der Zunge wurden mit feinen Stoßnadeln fixiert. Nach Abklingen der Irritation der Zungengefäße beim Herrichten des Präparates wurden dieselben im Mikroskop bei mittlerer, meist 60facher Vergrößerung, in durchscheinendem Licht beobachtet. Eine wassergefüllte Küvette schirmte die Wärmestrahlen ab. Nachdem sich ein etwa gleichbleibender Capillardurchfluß eingestellt hatte — meist war nur ein geringer Teil der Haargefäße durchströmt — wurden die Substanzen, die in Kaltblütler-RINGER gelöst waren, mit einer Pipette vorsichtig aufgetropft und daraufhin einsetzende Veränderungen der Durchblutung beobachtet. Der Durchmesser der größeren Gefäße wurde mit einem Okularmikrometer gemessen. Zum Teil wurde der Verlauf der Versuche auch mit der Mikrokamera von Leitz („Micca“) photographisch festgehalten.

Die im folgenden mitgeteilten Ergebnisse wurden durch Beobachtung an weit über 100 Tieren gewonnen. Bei den geringen, an der Grenze der Wirksamkeit liegenden Giftkonzentrationen war es möglich, am gleichen Präparat verschiedene Substanzen unmittelbar miteinander zu vergleichen. Bei der Testung der Schwellenkonzentration wurden etwa vier mal innerhalb der 10 min währenden Beobachtungszeit 4–6 Tropfen der Giftlösung auf die Zunge gegeben. Verschiedene Stellen der Zunge wiesen verschiedene Empfindlichkeit auf; die in der Zungenmitte über den Zungenmuskeln gelegenen Capillaren waren am reizbarsten, wahrscheinlich weil hier die Haargefäße am dichtesten unter der Epitheldecke gelegen sind. Indessen schwankte die Empfindlichkeit von Tier zu Tier relativ nur wenig. Die Untersuchungen wurden in den Wintermonaten durchgeführt.

Das pH der jeweils frischbereiteten Frosch-RINGER-Lösungen betrug 6,7; die damit bereiteten Chinonlösungen wichen in den stärksten verwendeten Konzentrationen höchstens um 0,2 davon ab. In Kontrolluntersuchungen konnte festgestellt werden, daß diese pH -Verschiebung ohne Wirkung auf die Capillaren ist.

a) Wirkung verschiedener Konzentrationen.

Die ausgeprägteste Wirkung auf die kleinsten Gefäße wurde bei 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon beobachtet. Im folgenden soll am Beispiel dieser Substanz stichwortartig die Veränderung der Durchblutung durch verschiedene Konzentrationen derselben beschrieben werden.

Molare Konzentration von 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon:

$2 \cdot 10^{-6}$: Meist angedeutete Wirkung: Nach einigen Minuten geringfügige Erweiterung und stärkere Füllung einer Reihe oberflächlich gelegener Capillaren.

$5 \cdot 10^{-6}$: Regelmäßig deutliche Wirkung: Nach 2—4 min Erweiterung und stärkere Füllung der Haargefäße, auch Eröffnung zahlreicher neuer Capillaren, recht deutliche Beschleunigung des Capillarflusses. Die Wirkung nimmt 8—10 min lang deutlich zu.

$1 \cdot 10^{-5}$: Ziemlich starke Wirkung: Nach 1—2 min ausgeprägte Erweiterung und Füllung der Capillaren, starke Beschleunigung der Stromgeschwindigkeit, deutliche Erweiterung der Arteriolen und kleinen Arterien, starke Füllung und Erweiterung der venösen Capillarschenkel und kleinen Venen.

$2 \cdot 10^{-5}$: Sehr starke Wirkung: Schnelles Einsetzen, beinahe maximale Füllung des gesamten Capillarnetzes und sehr starke Beschleunigung des Blutstromes, Erweiterung der Arteriolen und kleinen Arterien bis auf das Doppelte der Ausgangslage, starke Füllung der venösen Gefäßabschnitte.

b) Wirkungsstärke verschiedener Substanzen.

In der folgenden Aufstellung sind die Schwellenkonzentrationen wiedergegeben. Ihre Wirkung entspricht etwa der oben für 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon bei einer molaren Konzentration $5 \cdot 10^{-6}$ beschriebenen. Die Substanzen sind nach abnehmender Wirksamkeit geordnet.

Tabelle 3. *Schwellenkonzentrationen capillarerweiternder Wirkung an der Froschzunge.*

Substanz	Molare Konzentration
1 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon . .	$5 \cdot 10^{-6}$
2 2,3-Dimethyl-naphthochinon . . .	$1,2 \cdot 10^{-5}$
3 2-Methyl-naphthochinon	$2 \cdot 10^{-5}$
4 α -Naphthochinon	$2 \cdot 10^{-5}$
5 Toluchinon	$2,5 \cdot 10^{-5}$
6 2,6-Dimethyl-naphthochinon . . .	$2,5 \cdot 10^{-5}$
7 p-Benzochinon	$5 \cdot 10^{-5}$
8 p-Xylochinon	$5 \cdot 10^{-5}$
9 2-Methyl-3-oxy-naphthochinon . .	$1 \cdot 10^{-4}$
10 2,3-Dioxy-naphthochinon	$1 \cdot 10^{-4}$

Das Bild, das sich bei den verschiedenen Substanzen in dieser Schwellenkonzentration zeigte, war im wesentlichen ein gleiches. Bei noch etwas geringerer Konzentration war in einer Reihe von Fällen, z. B. bei α -Naphthochinon manchmal eine gewisse Verminderung des Capillardurchflusses festzustellen. Bei den in starker Verdünnung noch wirksamen Substanzen, besonders 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon und 2,3-Dimethyl-naphthochinon war im Bereich der Schwellenkonzentration die

Wirkung recht gut reversibel. Bei der Beobachtung gewann man den Eindruck, daß die Erweiterung der Arteriolen und kleinen Arterien bei den höheren Konzentrationen erst im Gefolge der Capillarerweiterung einsetzte.

Bei hoher Konzentration und längerer Einwirkung einiger Substanzen, z. B. α -Naphthochinon ($1 \cdot 10^{-3}$ molar, $1\frac{1}{2}$ stündige Einwirkung) kam es in einem Teil der Capillaren zu ausgedehnter Stasenbildung mit Lackfarbenwerden der Blutsäule; 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon, das in

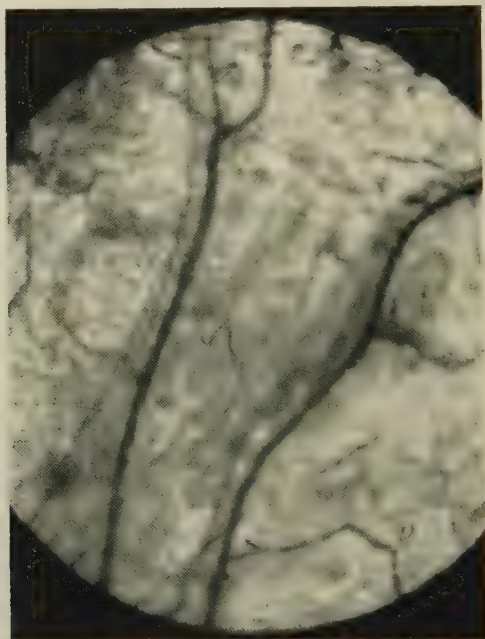


Abb. 1. Zungenausschnitt zu Beginn des Versuches: Nur einzelne Capillaren sind gefüllt.

geringerer Konzentration eine weit ausgeprägtere Wirkung als α -Naphthochinon aufwies, bewirkte dagegen in derselben hohen Konzentration keine deutlichen Stasen. — Austritt von Blutkörperchen aus den Gefäßen konnte auch bei mehrstündiger Beobachtung nicht festgestellt werden.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen denselben Zungenabschnitt vor Beginn des Versuches und nach 10 min während der Einwirkung von 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon in $2 \cdot 10^{-5}$ molarer Konzentration. (Bei derselben Konzentration ist bei dem stark schmerz- und entzündungserregenden α -Naphthochinon eine nur angedeutete Wirkung vorhanden!)

c) Capillaroskopische Untersuchungen am Kaninchenauge.

Weitere Untersuchungen wurden an der Conjunctiva und an der Nickhaut von Kaninchen angestellt. Dabei gelangte ein Capillarmikroskop mit Aufsichtbeleuchtung der Firma Leitz zur Verwendung. Im allgemeinen

konnten durch Anwendung ähnlicher Konzentrationen wie an der Froschzunge Erweiterungen der kleinsten Gefäße festgestellt werden. Jedoch konnten die Schwellenkonzentrationen, die an der Froschzunge mit befriedigender Genauigkeit ermittelt werden konnten, nicht bestimmt werden. Einzelne Substanzen, deren Vergleich besonders interessierte, wurden an den beiden Augen desselben Tieres unmittelbar miteinander verglichen. So konnte z. B. auch am Kaninchenauge festgestellt werden,

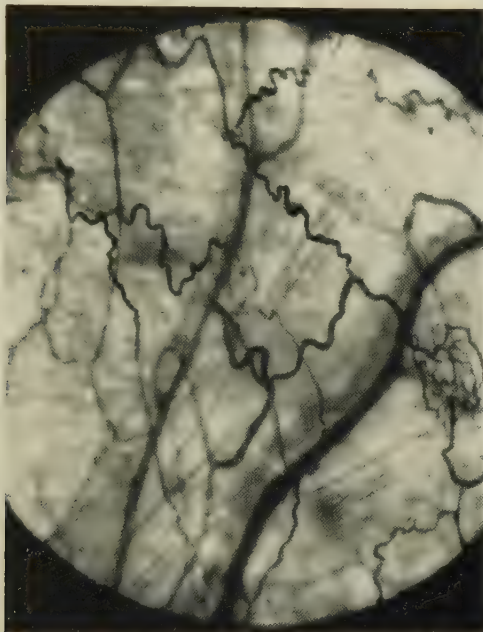


Abb. 2. Derselbe Zungenausschnitt nach 10 min während der Einwirkung von 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon in $2 \cdot 10^{-5}$ molarer Konzentration: Starke Füllung des Capillarnetzes.

daß 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon eine deutliche stärkere Erweiterung der kleinsten Gefäße bewirkt als α -Naphthochinon. Auffälligerweise war bei 2,3-Dimethyl-naphthochinon nur eine recht geringe Wirkung zu beobachten.

4. Hemmung der Dehydrasen.

Für einen Vergleich der lokalen Reizwirkung der Benzo- und Naphthochinone mit der Beeinflussung des Kohlenhydratabbaus durch diese Substanzen sind die in diesem Zusammenhang interessierenden Ergebnisse einer vorausgegangenen Arbeit (HERZ) über die Wirkung auf wasserstoffübertragende Fermente kurz angeführt:

Chinone und Naphthochinone bewirken an Froschmuskelsbrei mehr oder weniger ausgeprägte Hemmung der Dehydrasen. Die Dehydrierung der Brenztraubensäure wurde in starkem Maße, die der Citronensäure und Bernsteinsäure etwas weniger

beeinträchtigt. Einzelne Naphthochinone waren selbst als Wasserstoffüberträger wirksam, sowohl bei der Dehydrierung muskeleigenen Substrats als auch bei der Dehydrierung der Citronen- und Bernsteinsäure. Versuche mit Bernsteinsäuredehydrase aus Rinderherzen hatten ein entsprechendes Ergebnis.

Die folgende Aufstellung gibt die molaren Konzentrationen der verschiedenen Substanzen wieder, die bei einer 30 min währenden Inkubation eine 25% ige Hemmung der Dehydrase bewirkten.

	Bernsteinsäure- dehydrase aus Rinderherz	Brenztraubensäure- dehydrase in Froschmuskelbrei
α -Naphthochinon	$1,1 \cdot 10^{-5}$	
Toluchinon	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$0,7 \cdot 10^{-4}$
p-Benzochinon	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$
p-Xylochinon	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
2,3-Dioxy-naphthochinon	$1,8 \cdot 10^{-4}$	
2-Methyl-3-oxynaphthochinon	$2,8 \cdot 10^{-4}$	

Bei den Substanzen, die selbst in stärkerem Maße als Wasserstoffüberträger wirksam sein können, lautet die Reihenfolge abnehmender Giftigkeit für die Dehydrasen:

- 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon
- 2-Methyl-naphthochinon
- 2,6-Dimethyl-naphthochinon
- 2,3-Dimethyl-naphthochinon.

Die ersten drei sind in ihrer Toxizität zwischen p-Xylochinon und 2,3-Dioxy-naphthochinon einzuordnen. 2,3-Dimethyl-naphthochinon ist nahezu völlig ungiftig und müßte am Schluß obiger Aufstellung stehen.

Diskussion der Ergebnisse.

1. Schmerzerregung.

Bei den hier untersuchten Chinonen und Naphthochinonen liegen die schmerzwirksamen Grenzkonzentrationen in der gleichen Größenordnung wie bei den von FLECKENSTEIN geprüften, meist halogenhaltigen Schmerzstoffen.

Bei einem Vergleich der Reihenfolge abnehmender Schmerzwirksamkeit mit der der Dehydrasenhemmung zeigt sich gute Übereinstimmung: In beiden Fällen steht α -Naphthochinon an der Spitze, dann folgen die verschiedenen einkernigen Chinone in dichter Reihe; 2,3-Dioxy-naphthochinon und 2-Methyl-3-oxy-naphthochinon sind nur wenig wirksam. Bei den Naphthochinonen mit stärkerer katalytischer Wirkung steht in beiden Fällen 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon an erster Stelle, 2,6-Dimethyl-naphthochinon war nur wenig aktiv, das 2-Methylderivat nimmt eine Mittelstellung ein. Für 2,3-Dimethyl-naphthochinon konnte weder Schmerzwirksamkeit, noch deutliche Dehydrasenhemmung nachgewiesen werden.

Es wurde vorher gezeigt, daß einige Substanzen dadurch charakterisiert sind, daß bei ihnen der Schmerz erst nach einer gewissen Latenzperiode in voller Höhe in Erscheinung tritt. Bei einer Erklärung dieser Beobachtung wäre zunächst daran zu denken, daß diese Körper, im Gegensatz zu denjenigen mit sofortigem Schmerz eintritt, weniger schnell die Zellmembran zu durchdringen vermögen und dadurch eine verspätete Schmerzempfindung bewirken. Diese Substanzen mit verzögertem Schmerzeintritt besitzen etwa die gleiche Molekulargröße wie andere, sofort wirksame. Das mit Verzögerung schmerzwirksame 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon ist isomer mit dem sofort schmerzwirksamen 2-Methyl-3-oxy-naphthochinon. Eine langsamere Permeation der verzögert wirksamen Körper ist damit unwahrscheinlich. Auffallend ist dagegen, daß diese Substanzen identisch mit denjenigen sind, welche eine stärkere katalytische Fähigkeit aufweisen. Macht man sich die FLECKENSTEINSche Auffassung einer Oxydationshemmung als Ursache der Schmerzauslösung zu eigen, so wäre es denkbar, daß auf Grund der katalytischen Wirkung dieser Substanzen es eine gewisse Zeitspanne währt, bis die Hemmung wirksam wird und Schmerz eintritt.

Ein direkter Vergleich der schmerzerregenden Grenzkonzentrationen mit den Giftverdünnungen, die noch deutliche Dehydrasenhemmung im Froschmuskelbreiversuch bewirken, zeigt, daß z. B. die Werte für 25% ige Hemmung der Brenztraubensäuredehydrierung, die sich als am meisten empfindlich erwies, deutlich höher liegen als die Schwellenkonzentrationen der Schmerzerregung. Eine solche Gegenüberstellung erscheint uns, im Gegensatz zu FLECKENSTEIN nicht berechtigt, denn die Bedingungen sind in mancherlei Hinsicht sehr verschiedene: Bei irreversiblen Fermenthemmungen — um solche handelt es sich hier — ist für das Ausmaß der Hemmung nicht nur die Giftkonzentration, sondern auch das Verhältnis von Giftmenge zu Receptormenge von ausschlaggebender Bedeutung. Bei der intracutanen Injektion ist kaum eine Angabe über das Verhältnis der Giftmenge mit der sofort bei der Injektion mit dem Gift in Beziehung tretenden Gewebemenge möglich. Auch andere unterschiedliche Bedingungen, wie Verschiedenartigkeit des Gewebes (hier Nervenfasern, dort Muskelbrei), Inkubationszeit usw. stehen einem Vergleich der absoluten Werte entgegen.

2. Entzündungserregung.

Seit WOSKRESENSKY, der erste Darsteller des p-Benzochinons, 1838 festgestellt hatte, daß es einen „durchdringenden, die Augen zu Tränen reizenden Geruch“ habe, ist die allgemeine Reizwirkung der Substanzen dieser Körperklasse des öfteren beschrieben worden. Ödem und Blasenbildung bei Aufbringung von Benzochinon, Thymochinon und α -Naphthochinon auf die Haut, Erbrechen und Diarrhoe bei oraler Gabe beschreibt BRISMORET. Ähnliche Befunde erbrachten später FROMHERZ, RIEGEL, SHIMKIN u. a.

Die hier festgestellte Reihenfolge abnehmender Entzündungswirkung entspricht der Reihenfolge der Schmerzerregung weitgehend und stimmt auch in befriedigender Weise mit der relativen Giftigkeit für die Dehydrasen überein: die stärksten Erscheinungen bewirkt wiederum α -Naphthochinon, dann folgen die verschiedenen einkernigen Chinone. Unter den übrigen Naphthochinonen zeigen lediglich 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon und 2-Methyl-naphthochinon noch eine gewisse Wirkung. Bei den übrigen, offenbar weniger reizenden Körpern genügt die erreichbare Konzentration nicht, um noch deutliche Entzündungswirkungen auszulösen. Bei sämtlichen Substanzen waren, verglichen mit den schmerzauslösenden Schwellenwerten, zur Erzeugung deutlicher Entzündungserscheinungen sehr viel höhere Giftkonzentrationen erforderlich.

3. Wirkung auf die Capillaren.

Im Gegensatz zu Schmerz- und Entzündungserregung ist bei der Wirkung der Benzo- und Naphthochinone auf die Capillaren in niederer Konzentration eine Korrelation mit der relativen Dehydrasengiftigkeit nicht festzustellen. Als Beispiel sei nur auf die außerordentlich starke Capillarerweiterung durch 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon, die annähernde Wirkungsgleichheit von α -Naphthochinon mit dem 2-Methyl-derivat, sowie auf die starke Wirksamkeit von 2.3-Dimethyl-naphthochinon an der Froschzunge hingewiesen.

Bei hohen Giftkonzentrationen bestimmt die allgemeine Entzündungswirkung den Zustand der Capillaren. Dies zeigt der Vergleich von α -Naphthochinon mit 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon in 1/1000 molarer Konzentration: Hier kommt es bei der ersten Substanz, als Ausdruck der starken Permeabilitätserrhöhung der Capillaren, an der Froschzunge zu ausgedehnter Stase, während bei der zweiten Substanz, die in niederer Konzentration eine ungleich stärkere Capillarerweiterung bewirkt, auch in hoher Konzentration kaum Stase beobachtet wird. Auch am Kaninchenaugen war in niederer Konzentration bei 2-Methyl-5-oxy-naphthochinon eine stärkere Wirkung auf die kleinsten Gefäße zu beobachten als beim nicht substituierten Grundkörper, während in hoher Konzentration letzterer deutlich stärkere allgemeine Entzündungszeichen auslöste. Der bei niederer Konzentration auf die Capillaren ausgeübten Wirkung entspricht somit bei höherer Giftkonzentration nicht eine entsprechend starke allgemeine entzündliche Gewebsreaktion.

Es ist möglich, daß zwischen der hier festgestellten Wirkung auf die Haargefäße und der von italienischen Autoren beschriebenen „capillartropen Wirkung“ von Vitamin K₃ (2-Methyl-naphthochinon) Beziehungen bestehen. LEONARDI beschrieb Erweiterung des subpapillären Capillarnetzes nach intravenöser Injektion von 2-Methyl-naphthochinon, BERTOLI und URBINI eine ebensolche nach intracutaner Injektion und

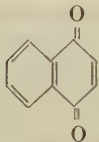
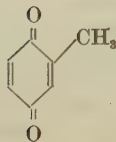
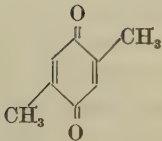
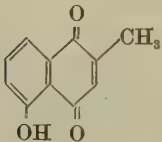
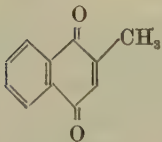
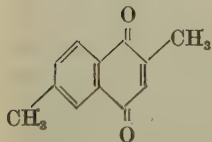
verglich diese lokale Gefäßreaktion mit der von Histamin. Toxische Dosen von Vitamin K₃ führen zu Capillarerweiterungen in Leber, Niere und Lunge, sie können von Blutaustritten begleitet sein (BERTOLI und BARATA; SHIMKIN).

Die Chinone sind recht reaktionsfähige, relativ unspezifisch wirksame Körper. Sie vermögen eine große Zahl von Fermentsystemen zu beeinflussen (Zusammenstellung bei HOFFMANN-OSTENHOF) (1950). Es interessiert hier, wie sie außer den Dehydrasen auch andere Phasen des Kohlenhydratabbaus zu beeinflussen vermögen. Untersuchungen von HOFFMANN-OSTENHOF und KRIZ (1949) an einer Reihe von Benzochinonen und Naphthochinonen über die Beeinflussung des Hefestoffwechsels zeigten, daß die Atmung durchwegs stärker gehemmt wird als die Glykolyse. In subletalen Konzentrationen bewirken sie, mit Ausnahme des α -Naphthochinons, Steigerung der Glykolyse. Bei den Naphthochinonen liegen auch einige Befunde über Hemmung der Glykolyse vor. BUEDING und PETERS studierten die Glykolysehemmung bei *Schistosoma mansoni*; 2-Methyl-naphthochinon war stärker wirksam als α -Naphthochinon und Toluchinon. GEMILL beschrieb Glykolysehemmung in Froschmuskelextrakten durch Naphthochinone; SUMMERSON zeigte, daß die endogene Glykolyse von Leukocyten und Leber durch 2-Methyl-naphthochinon nicht beeinflußt wird. WENDEL und BALL wiesen nach, das Naphthochinone, die in 2-Stellung eine Hydroxylgruppe, in 3-Stellung einen längeren Alkylrest tragen, starke Atemgifte sind. Ihr Angriffspunkt soll an einem bisher nicht näher identifizierten Faktor zwischen Cytochrom b und c liegen. Die Cytochromoxydase wird durch Chinone nicht gehemmt.

Bei den geprüften Substanzen stimmt die Reihenfolge der Schmerz-wirksamkeit weitgehend mit derjenigen der Entzündungserregung überein. Die verschiedene Größenordnung der Giftkonzentration in beiden Fällen spricht nicht gegen einen direkten Zusammenhang: bei der Testung der Schmerzerregung handelt es sich um Grenzkonzentrationen, die Wirkung war demnach auch nur eine sehr kurzdauernde. Bei der Prüfung der Entzündungswirkung dagegen wurden viel stärkere Reaktionen ausgelöst, ihre Dauer war eine ungleich längere; außerdem wurden die Substanzen auf die Oberfläche der intakten Schleimhaut gebracht.

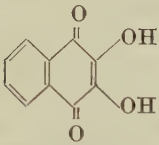
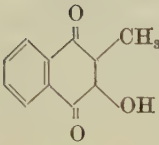
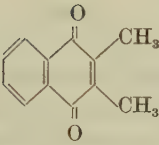
Von der Schmerz- und Entzündungserregung weicht die Wirkung auf die Capillaren in niederen Konzentrationen deutlich ab. An ihrem Zustandekommen dürften verschiedene Mechanismen beteiligt sein: Freisetzung histaminähnlicher Substanzen, direkte Wirkung auf die Capillaren, sowie Gefäßreflexe. Bemerkenswert erscheint, daß die Größenordnung der wirksamen Grenzkonzentrationen an der Froschzunge und der schmerzerregenden Schwellenwerte etwa gleich sind und trotzdem die Reihenfolge der Wirkung eine andere ist. Während am Zustandekommen der Capillarerweiterung freigesetzte histaminähnliche Substanzen zumindest beteiligt sein dürften, scheint Histamin bei der Auslösung des Hautschmerzes durch unsere Substanzen keine Bedeutung zu haben, denn das für die intracutane Histamininjektion charakteristische Jucken oder der durch Juckreiz begleitete Schmerz (ROSENTHAL) wurde in unseren Versuchen niemals beobachtet.

Die folgende Darstellung veranschaulicht in vereinfachter Form noch einmal das Wesentliche der Versuchsergebnisse.

	Dehydrasen- hemmung	Schmerz- wirkung	Entzündungs- erregung	Kapillar- erweiterung
	+++++	+++++	+++++	+++
	+++++	+++++	+++++	+++
	+++++	+++++	+++	++
	+++++	+++++	+++	++
	+++ K	+++ L	++	+++++
	+++ K	+++ L	+	+++
	++ K	++ L	+	+++

K: Substanzen, die selbst als Wasserstoffüberträger wirksam sein können;

L: Substanzen, die eine deutliche Latenzzeit der Schmerzerregung aufweisen.

	Dehydrasen- hemmung	Schmerz- wirkung	Entzündungs- erregung	Kapillar- erweiterung
	++	++	—	+
	+	+	—	+
	—	—	—	++++

Die für die geprüften Benzo- und Naphthochinone festgestellten Übereinstimmungen entsprechen weitgehend den von FLECKENSTEIN bei Halogenessigsäureestern, aliphatischen und aromatischen Ketonen sowie anderen halogenhaltigen, ungesättigten Verbindungen aufgezeigten Befunden (die Wirkung auf die Capillaren wurden allerdings dort nicht ermittelt). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen für eine größere Zahl homolog gebauter Körper desselben Bautyps eine offensichtliche Korrelation zwischen Dehydrasenhemmung und Schmerz- bzw. Entzündungserregung. Zweifellos stützen diese Befunde die nicht unwidersprochen gebliebenen Ansichten FLECKENSTEINS über Zusammenhänge lokaler Reizwirkung und Stoffwechselhemmung, zumindest soweit, als sie für die Chinone eine solche Korrelation aufzeigen. Die hier gefundene abweichende Wirkung auf die Capillaren in niederer Konzentration, was auch lokale Reizwirkung darstellt, verdeutlicht aber, daß auch noch andere Mechanismen eine Rolle spielen können und legt nahe, Verallgemeinerungen tunlichst zu vermeiden. Solches erscheint auch angebracht, solange augenscheinlich elektive Reizwirkungen verschiedener Substanzen auf Nerven, Gewebszellen oder Capillaren, worauf besonders HEUBNER hinweist, in ihrem Zustandekommen nicht geklärt sind.

Zusammenfassung.

Benzo- und Naphthochinone üben bei lokaler Einwirkung auf Haut und Schleimhäute einen mehr oder weniger starken Reiz auf diese aus. Vorhergegangene biochemische Untersuchungen hatten ergeben, daß diese Substanzen dehydrierende Fermente des Kohlenhydratabbaus in

unterschiedlichem Ausmaß hemmen. In Hinblick auf den keineswegs geklärten Mechanismus lokalreizender Wirkung wurde untersucht, ob Zusammenhänge mit der Störung des Kohlenhydratstoffwechsels bestehen.

Die Wirkung auf sensible Nervenendigungen, Gewebszellen und Capillaren wurde bei den verschiedenen zur Verfügung stehenden Körpern der Benzo- und Naphthochinonreihe quantitativ erfaßt. Eine Anzahl der Substanzen ist bei intracutaner Injektion stark schmerzwirksam. Im Selbstversuch wurden die Schwellenkonzentrationen ermittelt. Die allgemeine Entzündungswirkung wurde am Kaninchenaugen und an der Kaninchenhaut geprüft. Selbst in hoher Verdünnung bewirkt ein Teil der Substanzen Capillarerweiterung. An den Capillaren der Froschzunge wurden die wirksamen Grenzkonzentrationen ermittelt.

Die Reihenfolge der nach Schmerz- und Entzündungswirkung geordneten Substanzen ist eine annähernd gleiche und stimmt auch mit derjenigen der relativen Dehydrasentoxizität befriedigend überein. Die capillarerweiternde Fähigkeit weicht dagegen davon deutlich ab.

Die Frage, inwieweit die vorliegenden Untersuchungen für einen unmittelbaren Zusammenhang von lokaler Reizwirkung mit Fermenthemmung sprechen, wird diskutiert.

Literatur.

- ALBERICH u. BEIGLBÖCK: Wien. Arch. inn. Med. **1941**, 43, 145. — BACQ, Z. M.: Enzymologia **10**, 48 (1941). — BALL, E. G., ANFINSEN und COOPER: J. of Biol. Chem. **168**, 257 (1947). — BEIGLBÖCK u. BERTSCHINGER: Klin. Wschr. **1943**, 249. — BERTOLI, R., u. B. URBINI: Clin. Nuova, Roma **7**, Nr. 1, 2 (1948). — BERTOLI u. P. F. BARATA: Giorn. med. Marca trevig. Vol. X (1950). — BRISSEMORET: C. r. Soc. Biol. **59**, 483 (1905); **60**, 475 (1906). — BUEDING and PETERS: J. of Pharmacol. **101**, 211 (1951). — DANIELLI, J. F.: Cell Physiology and Pharmacology, New York 1950. — FLECKENSTEIN, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **203**, 151 (1944). — Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung. Frankfurt 1950. — FLURY, F., u. H. WIELAND: Z. exper. Med. **13**, 367 (1921). — FROMHERZ: Z. Vitaminforsch. **11**, 65 (1941). — GEMILL: J. of Pharmacol. **96**, 166 (1949). — HAAS, H. A. T., A. KRAUSHAAR u. C. A. CORDUA: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **209**, 138 (1950). — HERZ, A.: Biochem. Z. im Druck. — HEUBNER, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **107**, 129 (1925). — Nachr. Akad. Wissensch. Göttingen IIb, 1950 Nr. 5. Über lokale Reizwirkung. — HOFFMANN-OSTENHOF, O., u. E. KRIZ: Mh. Chem. **80**, 678 (1949). — HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, herausgegeben von L. ZECHMEISTER, Bd. VI, Wien 1950. — KÖHLER u. SCHARF: Med. Mschr. **5**, 113 (1951). — LEONARDI, G.: Clin. Nuova, Roma **2**, 155 (1946). — RIEGEL: Erg. Physiol. **43**, 133 (1940). — RIESER, O.: Helvet. med. Acta **9**, H. 6 (1942). — ROSENTHAL: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 167 (1950). — SHIMKIN: J. of Pharmacol. **71**, 210 (1941). — SUMMERSON: Fed. Proc. **2**, 72 (1943). — WENDEL: Fed. Proc. **5**, 406 (1946). — WOSKRESENSKY: zit. n. HOFFMANN-OSTENHOF (1950).

Dr. ALBERT HERZ, Pharmakolog. Inst. d. Univ. München.

Aus der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Frhr. v. KRESS).

Tierexperimentelle Leberfunktionsstudien.

I. Mitteilung.

Über das Verhalten der Serumeiweißkörper beim Kaninchen unter experimenteller chronischer Allylformiatvergiftung.

Von

M. KESSEL, P. KÖRTGE und F. A. PEZOLD.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. August 1953.)

Zahlreiche Autoren haben sich mit den Auswirkungen der Allylformiat(AF)-Vergiftung auf die Leber beschäftigt. Obwohl sich diese am gesamten Capillarsystem nachweisen lassen, ist die Leber immer bevorzugtes Studienobjekt gewesen. Ihre typische Blutversorgung gewährleistet eine besondere Konzentrierung des AF in den Lebersinusoiden.

EPPINGER hat als unmittelbare Folge der akuten AF-Intoxikation eine capilläre Durchlässigkeitssteigerung für Plasmaeiweiß beschrieben. Er verwies auf die anfängliche Abnahme des Albumin/Globulin-Quotienten im Blutserum bei gleichzeitigem Ansteigen dieses Quotienten in der Leber. Unter der Annahme einer physiologischen Undurchlässigkeit der Capillaren für Bluteiweißkörper schloß er aus seinen Feststellungen auf einen initialen Austritt der kleineren Albuminmoleküle aus der Blutbahn ins Interstitium und in die Gewebe. Diesen Vorgang nannte er „Albuminurie ins Gewebe“. Bei tiefergreifender Schädigung sah er in dem Wiederansteigen des Serumalbumin/Globulin-Quotienten einen indirekten Beweis dafür, daß nun auch die gröber dispersen Globuline ins Gewebe übertraten.

Durch die Untersuchungen mit radioaktiv markierten Proteinen ist die prinzipielle physiologische Capillardurchlässigkeit für alle Serumeiweißkörper erwiesen. Die Durchtrittsrate ist von der Porengröße der Capillarwand und von der Gestalt bzw. dem Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen abhängig. Bei experimentell oder pathologisch gesteigerter Permeabilität kommt es zu einer mehr oder minder gleichmäßigen Durchlässigkeit für sämtliche Eiweißmoleküle, so daß man nach WUHRMANN und WUNDERLY besser von einer „Proteinurie ins Gewebe“ spricht, wenn überhaupt dieser, der Nierennomenklatur entnommene Ausdruck für den hier statthabenden Vorgang verwendet werden soll. Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen verschiedener Körperflüssigkeiten mit dem jeweils zugehörigen Blutserum haben eine weitgehende Übereinstimmung in qualitativer Hinsicht erbracht. Solche Befunde wurden erstmalig von WALLENIUS am Liquor cerebrospinalis, von PERLMAN, GLENN, und KAUFMANN an der Lymphe, von WUNDERLY und CAGIANUT am Kammerwasser, von PERLMAN und KAUFMANN an der Synovialflüssigkeit, von KUTZIM am Cantharidenblaseninhalte und von PEZOLD und HINZ am Gewebssaft festgestellt. Die in neuerer Zeit häufiger auftauchenden Literaturangaben über prinzipiell gleiche Untersuchungsergebnisse mit Ödemflüssigkeiten, Transsudaten, Exsudaten und Ascites haben wir an eigenen Fällen

bestätigen können. Für die Leber schließen KÜHN und HILDEBRAND auf Grund des raschen Übertritts intravenös applizierter hochmolekularer Substanzen in die Leberlymphe und ihrer Verteilung in den verschiedenen Räumen (entsprechend dem Eiweißgehalt ihrer Medien) auf eine hohe Permeabilität der Sinusoide. Nach ihrer Auffassung ist die freie Passage der Plasmaeiweißkörper durch die intralobulären Capillaren überhaupt für die Leber die Voraussetzung zur Aufrechterhaltung ihrer exkretorischen und intermediären Aufgaben.

EPPINGERS Vermutung erscheint durch die erwähnten neueren Befunde widerlegt. Die Anwendung elektrophoretischer und immunochemischer Untersuchungsmethoden hat inzwischen klar gemacht, daß der mit einzelnen Aussalzungsmethoden gewonnene Albumin/Globulin-Quotient nicht den tatsächlichen Verhältnissen entspricht (MAJOOR, WUHRMANN und WUNDERLY, LANGE, BENNHOLD, OTT und KALLEE).

Es lag nahe, den Einfluß der experimentellen AF-Vergiftung auf die Serumeiweißkörper erneut, aber mit verfeinerter Methodik zu untersuchen. Man könnte erwarten, daß sich der Eiweißaustritt aus der Gefäßbahn unter AF-Applikation und die anschließenden Gewebsveränderungen, die unter anderem gerade die Leber in erheblichem Ausmaß treffen, sich im Verhalten der Blutplasmaeiweißkörper äußern.

Nun hat EPPINGER die akute von der chronischen Vergiftung mit Allylformiat nach ihren Verlaufsformen klar unterschieden. Während er in der akuten Form eine Art Modellversuch der „serösen Hepatitis“ im Sinne ROESSLES mit ihren typischen Abläufen sieht, demonstriert er mit der fortgesetzten Applikation kleinerer, nicht tödlicher Dosen von Allylformiat die Entwicklung eines chronischen Leberschadens, der schon makroskopisch an das typische Bild der menschlichen Lebercirrhose erinnert. Für die Klinik interessieren in diagnostischer und prognostischer Hinsicht besonders die chronischen Hepatitiden mit Übergängen in die Lebercirrhose. Für diese Verlaufsformen sind typische Veränderungen im Serumeiweißspektrum bekannt, die sich elektrophoretisch in erster Linie als Albuminverminderung und γ -Globulinvermehrung äußern.

Um solche klinischen Stadien gegebenenfalls in Parallele zum Tierversuch stellen zu können, haben wir uns zur Durchführung fortgesetzter AF-Applikation mit kleinen, nicht tödlichen Einzeldosen entschlossen. Fortlaufende Serumeiweißuntersuchungen solcher Versuchsreihen fehlen bisher. Als weiteres Ziel dieser Arbeit sehen wir die systematisch wiederholte Kontrolle einiger bekannter, auch in der Klinik durchführbarer Leberfunktionsproben an. Es wurden Serumlabilitätsproben (Cadmiumsulfatreaktion, WELTMANNSSches Koagulationsband, Nephelogramm nach WUNDERLY-WUHRMANN), elektrophoretische Serumuntersuchungen und der Bromsulphaleintest durchgeführt. Dieser zur Prüfung der exkretorischen Funktion der Leber besonders geeignete Test ist allgemein anerkannt. Seine besondere Empfindlichkeit haben wir an biotisch und durch Leberpunktion gesicherten Fällen von Leberkranken überprüft (BRAUN, MEX und PEZOLD). Im Rahmen der „Reaktionskonstellationen“ von WUHRMANN gestatten die ausgeführten Untersuchungen der Serumeiweißkörper eine recht brauchbare Aussage. Ihre Unspezifität braucht

hier nicht erneut betont zu werden. Zuletzt sollten histologische Untersuchungen uns eine Aussage über das dem jeweiligen Funktionsverhalten entsprechende pathologisch-anatomische Substrat ermöglichen. Darüber wird in einer späteren Mitteilung berichtet.

Für die Ausführung der Serumelektrophorese genügen seit der Entwicklung brauchbarer Papierelektrophoresemethoden zu einer einmaligen Analyse 0,01 bis 0,02 cm³ Serum. Über die Zuverlässigkeit der Methode muß auf die umfangreiche diesbezügliche Literatur verwiesen werden.

Eigene Untersuchungen.

I. Material und Technik.

Wir haben trotz einiger, in der Literatur (EPPINGER, POPPER) geäußerter Bedenken Kaninchen benutzt, da sie sich sowohl zur experimentellen AF-Vergiftung (HEINEMANN), als auch zur elektrophoretischen Untersuchung der Serumproteine sehr wohl eignen. Neben vereinzelten Untersuchungen mit der TISELIUS-Apparatur sind bisher Mikrobestimmungen mit dem ANTWEILER-Gerät von STÜRMER und papierelektrophoretische Untersuchungen von SCHEIFFARTH und BERG an normalen Kaninchen durchgeführt worden. Das Kaninchen hat zwar ein individuelles Eiweißbild. Aber es bleibt unter normalen Bedingungen über längere Zeit konstant. Unter diesen Umständen sind fortlaufende Kontrolluntersuchungen am gleichen Tier berechtigt.

Wir haben insgesamt 4 männliche und 14 weibliche gesunde Kaninchen im Gewicht von 2,8—4,5 kg in den Versuch genommen. Die Tiere, in Gruppen von je 6 Tieren eingeteilt und unter gleichen äußeren und diätetischen Bedingungen gehalten, sind täglich mit 20, 30 und 40 mg Allylformiat (Dichte 0,948 bei 18° C, Siedepunkt 83,6° bei 768 mm Hg)¹ pro Kilogramm Körpergewicht durch subcutane Applikation unter die Rückenhaut über längere Zeiträume behandelt worden. Zur Untersuchung der Normalwerte wurden 32 gesunde, unbehandelte Kaninchen herangezogen. Unter ihnen waren die oben erwähnten 18 später in den Allylformiatversuch genommenen Tiere. Die Tiere sind während der Versuchsdauer hinsichtlich ihres Verhaltens (Gewicht, Freßlust, Haarausfall, intercurrente Erkrankungen usw.) laufend beobachtet worden. Die erforderlichen kleinen Blutmengen lassen sich leicht aus den Ohrvenen der Kaninchen entnehmen. Wir haben jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Beobachtungen haben sich über 6 Monate erstreckt.

Zur Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung der Serumeiweißfraktionen bedienen wir uns der Filterpapiermethode am hängenden Streifen nach WUNDERLY (Puffer pH 8,8, 6,5 mA 110 V). Um vergleichbare Werte zu erhalten, tragen wir stets konstante Eiweißmengen auf, die sich entsprechend dem verschiedenen Gesamtproteingehalt der jeweiligen Seren in wechselnden Volumina finden. In der vorliegenden Versuchsreihe sind stets 2 mg Protein auf MUNKTELL-Papier (GRYCKSBO, Schweden) aufgetragen worden. Die fertig aufgetrennten Streifen werden mit Bromphenolblau nach DURRUM gefärbt. Diese Methode hat sich uns besonders wegen der guten Entfärbbarkeit der eiweißfreien Papierabschnitte bewährt. Außerdem ist dieser Farbstoff nach eigenen Untersuchungen (PEZOLD und PEISER) in eiweißhaltiger Lösung mindestens für die zur Durchführung der Eluatphotometrie erforderliche Zeit konstant, im Gegensatz zu Amidoschwarz 10 B, das

¹ Wir danken Herrn Prof. JUNKMANN (Leiter des Chem. Zentrallaboratoriums der Firma Schering, Berlin-West) für die Überlassung des Allylformiates.

nach Elution aus dem Papier mit $n/20$ NaOH schon nach 40 min erhebliche Abnahmen der Extinktionswerte zeigt. (Für die Direktcolorimetrie des transparent gemachten, amidoschwarzgefärbten Papiers gilt diese Einschränkung allerdings nicht.) Auf Grund teilweise schlechter Erfahrungen mit different anzeigenden Photoelementen der käuflichen Auswertgeräte für das Transparenzverfahren haben wir die vorliegenden Messungen nach vollständiger Elution des in kleine Streifenabschnitte zerschnittenen Filterpapiers im Elektrophotometer „Elko II“ von Zeiß-Opton mit Filter S 57 durchgeführt. Zur Errechnung der relativen Prozentwerte aus den Extinktionswerten muß bei der Bromphenolblaufärbung ein Korrekturfaktor angewendet werden. Für die γ -Globuline verwenden wir auf Grund eigener Untersuchungen (PEZOLD und PEISER) zur Umrechnung den Faktor 1,1, während wir für die übrigen Globulinfractionen den von CREMER und TISELIUS, sowie SCHNEIDER vorgeschlagenen Korrekturfaktor von 1,6 gewählt haben. Der relativen Fehlerbreite, besonders im Hinblick auf die lipoidtragenden Fraktionen, sind wir uns bewußt. Da jedoch die Abweichungen bei allen Kontrolluntersuchungen die gleichen sind, sind signifikante Veränderungen der einzelnen Werte auf quantitative Veränderungen der Serumfraktionen zu beziehen.

Als orientierende Vorversuche zur Prüfung der Serumlabilität haben wir bei allen Tieren das WELTMANNsche Koagulationsband und die Cadmiumsulfatprobe nach WUNDERLY und WUHRMANN, sowie beim „verschleierten“ WKB auch noch das Nephelogramm nach WUNDERLY und WUHRMANN ausgeführt.

II. Ausgangswerte.

Eine Übersicht über die papierelektrophoretisch gewonnenen Serum-eiweißwerte¹, sowie einiger Serumlabilitätsproben *gesunder unbehandelter Kaninchen* gibt die Tabelle 1.

Demnach finden sich folgende Schwankungsbreiten:

Für Albumin von 58—74%; für α -Globulin (Gesamtfraktion) von 5—17%; für β -Globulin von 4—17%; für γ -Globulin von 6—22%.

Bei Vernachlässigung der Extremwerte ergeben sich folgende Mittelwerte:

Für Albumin 67% ($\pm 5\%$); für α -Globulin 11% ($\pm 2\%$); für β -Globulin 8% ($\pm 3\%$); für γ -Globulin 14% ($\pm 4\%$).

Diese tabellarische Übersicht zeigt, daß unsere Werte mit den in der Literatur angegebenen im ganzen gut übereinstimmen. Eine Trennung der α -Globuline von den Albuminen ist uns stets gut möglich gewesen. Dagegen läßt sich bei Kaninchen eine Trennung von α_1 - und α_2 -Globulin nicht in allen Fällen mit hinreichender Genauigkeit durchführen. Wir haben deshalb in den Fällen, wo dies nicht möglich war, die α -Globulinfraktion als Ganzes erfaßt.

Es scheint uns jedoch angebracht, darauf hinzuweisen daß die von uns ermittelten γ -Globulinwerte der Normaltiere nicht so niedrig liegen, wie die kürzlich von SCHEIFFARTH und BERG mitgeteilten. Möglicherweise liegt dies in der Auswertungsmethodik beim Transparenzverfahren begründet. Dieser Unterschied ist

¹ Untersucht von cand. med. G. GRÜNERT.

natürlich für die Bewertung unserer experimentellen Ergebnisse von Wichtigkeit. In guter Übereinstimmung befinden wir uns dagegen mit STÜRMER, der etwa die gleichen Werte, allerdings mit dem ANTWEILER-Gerät, an normalen Kaninchen festgestellt hat.

Tabelle 1. *Serumeiweißwerte unbehandelter Kaninchen.*

Tier Nr.	Albumin %	Globulin %				WKB Röhrchen Nr.
		α_1	α_2	β	γ	
12	64		9	17	10	1—6
13	61	3	6	8	22	1—6
14	59	8	5	9	19	1—6
15	72	6	4	7	11	1—6
16	69	2	3	10	16	1—6
17	69		7	5	19	—
18	66	3	5	7	19	1—5
19	63		11	10	16	1—7
20	72	3	4	6	15	1—7
21	60		13	10	17	1—6
22	58	8	5	14	15	1—5
23	59		15	9	17	1—6
24	71		12	8	9	1—6
25	67		6	5	22	1—7
26	65		10	11	14	1—6
27	73		11	10	6	1—7
28	74		10	6	10	1—6
29	70		9	4	17	—
30	62		11	11	16	1—4
31	69		10	10	11	1—5
32	66		11	10	13	1—5
33	67		10	12	11	1—5
34	66		11	9	14	1—6
35	62		17	7	14	1—6
36	64	8	5	11	12	1—6
37	61	9	5	7	18	1—8
38	68		9	10	13	1—6
39	65		11	9	15	1—6
40	59		12	13	16	1—6
41	60		12	17	11	1—6
42	65		7	13	15	1—7
43	66		12	11	11	1—6

Die Cadmiumsulfatreaktion hat bei allen Normaltieren ein negatives Ergebnis erbracht. Das WKB reicht gewöhnlich von Röhrchen I—V, gelegentlich bis VII als normaler Schwankungsbreite. Das Nephelogramm hat sein Trübungsmaximum beim Normaltier zwischen 600 bis 800 rel. Trübungseinheiten. Es ist weder nach rechts noch nach links verschoben.

Versuchsreihe I (20 mg AF pro kg et die).

Die Tiere erhielten unter den oben genannten Versuchsbedingungen täglich 20 mg AF subcutan. Sämtliche 6 Tiere zeigten keine wesentlichen

Reaktionen auf die täglichen Injektionen. Die Gewichtskurven waren unauffällig. Lediglich gegen Ende der ersten Woche kam es zu *geringen Gewichtsabnahmen* und zum *Haarausfall* an den Flanken. Gegen Ende der Versuchsperiode, d. h. zwischen dem 80. und 90. Tag nach Beginn der täglichen AF-Injektionen kam es zu größeren Schwankungen im Gewicht. Es überlebten 5 Tiere.

Tabelle 2. Verhalten der Serumeiweißwerte bei langdauernder Zufuhr von 20 mg AF pro kg pro die.

Tier Nr.	AF-Dosis (pro kg Körpergewicht/die) mg	Versuchstag	Albumin %	Globulin %				WKB Röhrchen Nr.	Bemerkungen
				α_1	α_2	β	γ		
12	20	0	64	9	17	10		1—6	spontan nach 98 Tagen gestorben
		13	56	4	4	18	18	1—7	
		37	75		8	4	13	1—8	
		49	74		8	7	11	1—8	
		90	67		13	9	11	1—6	
13	20	0	61	3	6	8	22	1—6	
		13	57		13	13	17	1—5	
		37	72		10	5	13	1—5	
		49	67		10	8	15	1—6	
		90	48		15	10	27	1—6	
14	20	0	59	8	5	9	19	1—6	
		20	69		9	6	16	1—6	
		38	56		14	8	22	1—5	
		47	63		11	8	18	1—8	
		88	59	7	5	13	16	1—5	
15	20	0	72	6	4	7	11	1—6	
		20	67	7	6	9	11	1—5	
		38	52		15	13	20	1—4	
		47	60		12	13	16	1—6	
		88	67		12	6	15	1—4	
16	20	0	69	2	3	10	16	1—6	Weitere Abnahme technisch unmöglich
		19	60		12	9	19	1—7	
18	20	0	66	3	5	7	19	1—5	
		19	49		11	10	30	1—7	
		33	49		9	4	38	—	
		40	56		8	7	29	1—6	
		83	52		7	5	36	1—8	

Wie obige Tabelle darstellt, findet sich bei allen Tieren eine teilweise, allerdings nur vorübergehende relative Albuminverminderung. Der niedrigste Wert liegt teils in der Mitte, teils am Ende der Versuchsperiode. Die Albumine waren maximal um 28%, minimal um 6% vermindert.

Diese Albuminverminderung erfolgt mit einem mehr oder weniger gleichmäßigen Anstieg aller Globulinfractionen. Eine alleinige γ -Globulinzunahme haben wir nur gelegentlich gesehen. Bemerkenswert ist die Unruhe der β -Fraktion. Die Cadmiumsulfatreaktion war bei sämtlichen Tieren in allen Kontrollen negativ. Das WKB läßt sich nicht eindeutig verwerten; auch das Nephelogramm kann keine weitere Klärung bringen.

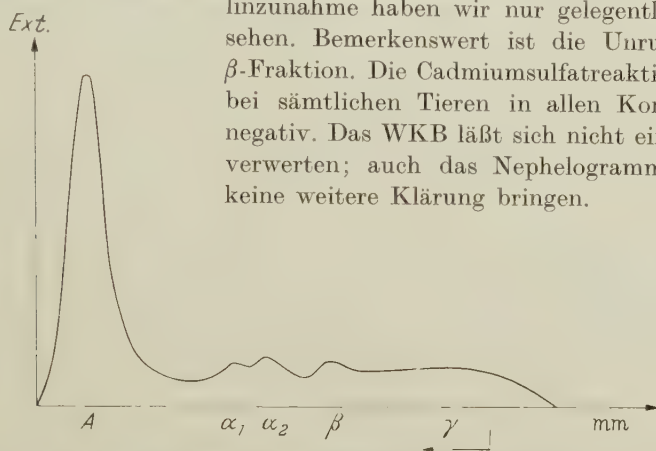


Abb. 1. Elektrophoresediagramm: Tier Nr. 14, vor Versuchsbeginn. Eiweißwerte siehe Tab. 1.

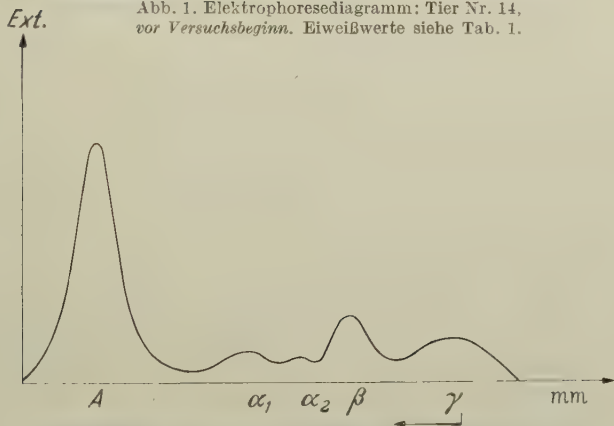


Abb. 2. Elektrophoresediagramm: Tier Nr. 14, nach 88 Tagen AF-Zufuhr (20 mg pro kg et die). Eiweißwerte siehe Tabelle 2.

Versuchsreihe II (30 mg AF pro kg et die).

Im Gegensatz zu den Tieren der Versuchsreihe I waren die Allgemeinerscheinungen bei der 30 mg AF-Vergiftung wesentlich stärker. Es fand sich ein erheblicher initialer Gewichtsverlust, die Freßlust war ebenfalls

Tabelle 3. *Verhalten der Serumeiweißwerte bei langdauernder Zufuhr von 30 bzw. 40 mg AF (pro kg et die).*
(Ergebnisse der Versuchsreihe II und III.)

Tier Nr.	AF-Dosis (pro kg et die) mg	Versuchstag	Albumin %	Globulin. %				CdSO ₄ - Reaktion	WKB Röhrchen Nr.	Bemerkungen
				α_1	α_2	β	γ			
20	30	0	72	3	4	6	15	Ø	1—7	
		7	65		11	7	17	(+)	1—5	
		24	54		12	16	18	Ø	1—5	
		66	56		12	15	17	Ø	1—5	
23	30	0	59		15	9	17	Ø	1—6	
		7	51		11	22	16	(+)	1—5	Spontan am 37. Tag gestorben
		24	51		16	13	20	Ø	—	
28	30	0	74		10	6	10	Ø	1—6	
		36	52		13	17	18	Ø	—	
		63	42		15	24	19	Ø	1—6	
30	30	0	62		11	11	16	Ø	1—4	
		36	36		25	27	12	Ø	1—3	Spontan am 65. Tag gestorben
		63	44		12	22	22	(+)	1—6	
31	30	0	69		10	10	11	Ø	1—5	
		31	57		11	14	18	Ø	1—6	
		58	68	6	3	10	13	Ø	1—6	
24	40	0	71		12	8	9	Ø	1—6	
		2	62		8	20	10	Ø	—	am 3. Tag spontan verstorben
		3	62		9	16	13	Ø	1—7	
25	40	0	67		6	5	22	Ø	1—7	nach dem 8. Tag weitere Blut- entnahmentechnisch unmöglich.
		2	59		8	9	24	Ø	1—6	
		3	62		8	7	23	Ø	1—6	
		4	64	4	3	9	20	Ø	1—6	Tier verstarb am 41. Tag
		5	62		8	11	19	Ø	1—6	
		8	59	4	4	10	23	Ø	—	
26	40	0	65		10	11	14	Ø	1—6	
		2	64		10	15	11	Ø	1—6	am 6. Tag spontan verstorben
		4	60		11	13	16	Ø	—	

herabgesetzt, auch fand sich Haarausfall und teilweise Hautnekrosenbildung an den Injektionsstellen, die jedoch trotz weitergeführter Vergiftung zur Abheilung kamen. Außerdem wurde eine bereits früh einsetzende Bluteindickung beobachtet, die teilweise die Blutentnahmen

sehr erschwerte. Ein Tier starb spontan am 18. Tag, ein weiteres am 39. Tag, so daß sie für die folgenden Untersuchungen ausfielen. Bei den überlebenden wurde der Versuch bis zu 2 Monaten durchgeführt, zu welchem Zeitpunkt das Allgemeinbefinden der Tiere unauffällig war. Die AF-Zufuhr wurde jetzt abgesetzt, da der Bromsulphalein-Test inzwischen einen pathologischen Verlauf zeigte. Daraus war analog unseren Erfahrungen in der Klinik auf eine Leberfunktionsstörung der Tiere zu schließen. Außerdem war zu diesem Zeitpunkt etwa die gleiche Gesamtdosis wie in der Versuchsreihe I erreicht.

Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, zeigt die Papierelektrophorese der untersuchten Sera trotz höherer Dosierung und stärkerer Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens keine wesentlich größeren Veränderungen gegenüber der Versuchsreihe I (Tab. 2). Die Cadmiumsulfatreaktion war lediglich in 3 Untersuchungen fraglich positiv, das WKB und das Nephelogramm ließen sich wiederum nicht verwerten.

Versuchsreihe III (40 mg AF pro kg et die).

Von den 6 mit 40 mg AF vergifteten Tieren kamen 3 (nicht in Tab. 3 aufgeführt) innerhalb von 3 bzw. 5 Tagen unter Krampferscheinungen ad exitum. Bei der hochgradigen Bluteindickung war es nicht möglich, von diesen schwer geschädigten Tieren Entnahmen aus der Ohrvene durchzuführen. Infolgedessen gelang es nur bei 3 Tieren, das Bluteiweißbild zu beobachten, und zwar bis längstens 8 Tage, da ein Tier jetzt eine starke Bluteindickung zeigte und die beiden anderen verstarben.

Innerhalb des angegebenen Zeitabschnittes fand sich weder ein stärkerer Albuminverlust noch eine wesentliche Verschiebung der γ -Globulinfraktion. Lediglich die β -Globuline wiesen in 2 von 3 Fällen eine Zunahme auf (siehe Tab. 3). Cadmiumsulfatreaktion, WKB und Nephelogramm wiesen keinerlei pathologisches Verhalten auf.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei längerdauernder Applikation verschiedener Dosen AF (20, 30 bzw. 40 mg AF/kg/die) zeigt das Bluteiweißbild des Kaninchens bei fortlaufender Untersuchung nur eine *mäßige, teilweise nur vorübergehende Albuminverminderung ohne charakteristische γ -Globulinvermehrung*. Auffällig waren vorübergehende Anstiege der β -Globulinfraktion. Auch im *humoralen Blutbild* findet sich *keine typische „Reaktionskonstellation“* gemäß der Definition von WUHRMANN. Eine Beziehung des Eiweißspektrums zur Dosierung, wie auch zum Allgemeinzustand der Tiere läßt sich nicht feststellen. Dies ist besonders bemerkenswert bei den mit 40 mg pro kg et die injizierten Tieren, die meist bereits nach kürzerer Zeit spontan ad exitum gekommen sind.

Bei mittelschweren und schweren Verlaufsformen von Leberparenchymschäden des Menschen im Zusammenhang mit Virushepatitiden — 63 Fälle — haben wir durch fortlaufende papierelektrophoretische Untersuchungen bzw. Serumlabilitätsprüfungen (KÖRTGE) nahezu regelmäßig signifikante γ -Globulinvermehrungen in erster Linie auf Kosten der Albumine gefunden. Postuliert man eine Leberparenchymschädigung durch AF beim Kaninchen, so ist aus unseren Versuchen zu ersehen, daß sich *bezüglich der Bluteiweißbilder des Kaninchens keine Analogieschlüsse zum Leberparenchymschaden des Menschen* ziehen lassen.

Aus dem neueren Schrifttum ist bekannt, daß *akute* experimentelle Schädigungen des Leberparenchyms sich im elektrophoretisch gewonnenen Serumeiweißspektrum nicht äußern, was erst kürzlich KÜHN und HILDEBRAND bei der akuten Tetrachlorkohlenstoffvergiftung am Hund bestätigt haben. Ob man die akute AF-Vergiftung im Sinne EPPINGERS als primäre capilläre Durchlässigkeitssteigerung für Bluteiweißkörper mit „Albuminurie ins Gewebe“, oder als ein im Gefolge der Epithelläsion auftretendes „toxisches Ödem“ der Leber (TERBRÜGGEN und DENECKE, W. DOERR) ansieht, ist für unsere Fragestellung ohne Bedeutung.

Über die Veränderungen bei *chronischer* AF-Vergiftung am Kaninchen liegen nur sporadische Mitteilungen vor (HEINEMANN, GLOGGENGIESSER, TERBRÜGGEN, DENECKE). Mit einer größeren Gesamtdosis innerhalb längerer Behandlungszeit hat nur HEINEMANN gearbeitet (1937). Es erscheint gesichert, daß AF nicht nur auf die Capillarwand, sondern gleichzeitig auf die Leberparenchymzelle toxisch wirkt. FLECKENSTEIN sieht nicht den physikalischen Vorgang der Permeabilitätsstörung, sondern den direkten Angriff auf das Fermentsystem der Zelle im Vordergrund der AF-Intoxikation. Es erfolgt gleichzeitig eine „Proteolyse und Nekrolyse im Leberparenchym, die erst später unter dem Einfluß der in den Exsudaten vorhandenen gerinnungsfördernden Fermente zur Koagulationsnekrose führt“ (TERBRÜGGEN). Über Lebereiweißveränderungen haben TERBRÜGGEN und DENECKE und über funktionelle Stoffwechselveränderungen (allerdings an der Ratte) BENDA, LOCKER und RISSEL berichtet. Alle Autoren sind sich darüber einig, daß nach chronischer AF-Applikation erhebliche morphologisch faßbare Veränderungen in der Leber auftreten. Über die an den Lebern unserer Versuchstiere festgestellten histologischen Untersuchungsbefunde soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

Es erscheint auffällig, daß unsere Albuminwerte bei fortlaufender Applikation der gleichen AF-Dosis bei etwa der Hälfte der Tiere zunächst abfallen, um sich nach einer gewissen Zeit wieder dem Ausgangswert zu nähern. Es wäre zu erwägen, ob hier im Sinne HEUBNERS eine Änderung im Verhalten des Organismus auf die wiederholte Einwirkung derselben Schädlichkeit vorliegt. Andererseits wäre auch denkbar, daß entsprechend der von manchen Autoren bei der „experimentellen Hepatitis“ beschriebenen gut ausgeprägten reparativen Tendenz, die Serumeiweißwerte sich wieder normalisiert haben.

Die verschiedenartigen Abläufe (Restitutio ad integrum, akute gelbe Leberdystrophie, Lebereirrhose) sind auch in der menschlichen Pathologie bekannt. Die Serumelektrophoresebefunde der chronischen Verlaufsformen der *menschlichen* Hepatitis sind nach unserer Erfahrung einheitlicher: Nahezu regelmäßig sieht man eine γ -Globulinvermehrung, weniger häufig eine β -Globulinvermehrung. Diese Verschiebungen werden, soweit sie zugunsten der γ -Globuline erfolgen, im Verein mit

der Albuminabnahme unter anderem mit dem Positivwerden der TAKATA-Reaktion, der Verlängerung des WELTMANNschen Koagulationsbandes und Erniedrigung bzw. Rechtsverschiebung des WUNDERLYSchen Nephelogrammes in Verbindung gebracht. Bei den Fällen mit zusätzlicher β -Globulinvermehrung finden wir gewöhnlich einen stark positiven Thymoltrübungstest, der bei alleiniger γ -Globulinvermehrung schwächer positiv ausfällt. Die *Albuminverminderung* erfolgt einmal im Rahmen des bekannten inversen Reaktionsmechanismus, zum anderen aber mehr oder weniger direkt proportional der Schwere des Krankheitsverlaufs. Bei starkem Albuminverlust im Stadium der dekompenzierten Lebercirrhose ist die Hypalbuminämie besonders augenfällig. Dann ist sie gewöhnlich auch mit einer Hypoproteinämie verbunden.

In den angeführten Tierversuchsreihen haben wir auch nach Zufuhr hoher AF-Dosen keine pathologischen Werte der Serumlabilitätsteste festgestellt, was gut mit den im Durchschnitt nur leicht erhöhten γ -Globulinwerten übereinstimmt. *Unsere Untersuchungsergebnisse* lassen mit aller Vorsicht (relativ geringe Anzahl von Tieren!) den Schluß zu, daß *beim Kaninchen bei chronischer AF-Vergiftung trotz offensichtlich eingetretener Leberschädigung der Eiweißstoffwechsel nicht erheblich gestört* worden ist. Rückschlüsse auf eine Schädigung der Serumalbuminbildung in der Leber durch chronische AF-Vergiftung — wie weit eine extrahepatische Albuminsynthese möglich ist, sei dahingestellt — können aus unseren Versuchsergebnissen nicht gezogen werden.

Zusammenfassung.

Bei protrahierter Allylformiateinwirkung mit den von uns gewählten Dosen wird mittels papierelektrophoretischer Untersuchungen des Serumeiweißspektrums von Kaninchen nur eine mäßige, teilweise sogar nur vorübergehende Albuminverminderung festgestellt. Eine eindeutige und bleibende γ -Globulinvermehrung tritt nicht ein. Eine starke „ β -Globulinunruhe“ ist auffällig. Es werden auf Grund des Serumeiweißverhaltens gegen die Heranziehung der chronischen Allylformiatvergiftung als Modellversuch der Entwicklung eines chronischen Leberschadens, sowie gegen die daraus gezogenen Analogieschlüsse auf die Vorgänge in der menschlichen Leber Bedenken geäußert.

Literatur.

BENDA, L., A. LOCKER u. E. RISSEL: Zellstoffwechsel und Entzündung. I. Mitt.: Stoffwechselveränderungen in der Leber nach Allylformiatvergiftung. *Z. exper. Med.* **117**, 519 (1951). — BENNHOLD, H., H. OTT u. E. KALLEE: Über die Azorubinbindung an Humanserum. *Hoppe-Seyler's Z.* **287**, 185 (1951). — BRAUN, G., A. MEX u. F. A. PEZOLD: Klinische und experimentelle Studien über den „Bromsulphaleintest“. *Dtsch. Arch. klin. Med.* **200**, 520 (1953). — CREMER, H. D., u. A. TISELIUS: Elektrophorese von Eiweiß in Filtrierpapier. *Biochem. Z.* **320**, 273 (1950). — DOERR, W.: Pathologische Anatomie der Glykolvergiftung und des Alloxandabetes. 7. Abh., Sitzungsberichte Heidelberger Akademie d. Wissenschaften. Mathemat.-naturwissenschaftl. Klasse, Heidelberg 1949. — DURRUM, E. L.: A microelectrophoretic and microionophoretic technic. *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2943

(1950). — EPPINGER, H.: Über Permeabilitätsänderungen im Kapillarbereiche. Verh. dtsh. Ges. Kreislauffschg. XI. Dresden u. Leipzig 1938. — Permeabilitäts-pathologie. Wien 1949. — FLECKENSTEIN, A.: Beitrag zum Mechanismus der experimentellen serösen Entzündung durch Allylformiat. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 151 (1944). — GLOGGENGIESSER, W.: Experimentell-morphologische u. systematische Untersuchungen über die seröse Entzündung der Leber, nebst Beiträgen experimenteller Leberschädigungen durch Bakterien, Bakterientoxine und mechanisch-operative Eingriffe. Virchows Arch. **312**, 63 (1944). — HEINEMANN, K.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der serösen Entzündung bei Ratten, Kaninchen und Katzen. Beitr. path. Anat. **98**, 545 (1936/37). — HEUBNER, W.: Vortrag auf der 15. Tagung dtsh. Ges. Verd.-Stoffw. Krkht. 1950. — KÖRTGE, P.: Vergleichende Untersuchungen über den diagnostischen Wert des Nephelogramms nach WUNDERLY-WUHRMANN bei Lebererkrankungen. Ärztl. Wschr. **1953**, 567. — KÜHN, H. A., u. G. HILDEBRAND: Untersuchungen über die Leberlymphe. I. Mitt.: Eiweißgehalt und Verteilung der Fraktionen in Blut und Leberlymphe normaler Hunde und Katzen und tetrachlorkohlenstoffvergifteter Hunde. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 43 (1953). — II. Mitt.: Übertritt von kolloidalen Farbstoffen und hochmolekularen Substanzen aus dem Blut in die Leberlymphe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 366 (1953). — LANGE, C.: Interpretation of findings in cerebrospinal fluid; technique and systematic interpretation of albumin-globulin ratio in cerebrospinal fluids. J. Labor. a. Clin. Med. **31**, 552 (1946). — KUTZIM, H.: Elektrophoretische Untersuchungen von Cantharidenblaseninhalten und Blutserum. Münch. med. Wschr. **1951**, 2603. — MAJOOOR, C. L. H.: The possibility of detecting individual proteins in bloodserum by differentiation of solubility in concentrated sodium sulfatesolution. J. of Biol. Chem. **169**, 583 (1947). — PERLMANN, G. E., W. W. L. GLENN and D. KAUFMAN: Changes in electrophoretic pattern in lymph and serum in experimental burns. J. Clin. Invest. **22**, 627 (1943). — PEZOLD, F. A., u. G. HINZ: Elektrophoretische Untersuchungen der Eiweißkörper im „Gewebssaft“. Klin. Wschr. **1953**, 600. — PEZOLD, F. A., u. U. PEISER: Untersuchungen über die Affinität papierelektrophoretisch aufgetrennter und denaturierter Serumproteinfraktionen gegenüber den Eiweißfarbstoffen Amidoschwarz, Azocarmin und Bromphenolblau. Klin. Wschr. **1953**, 982. — SCHNEIDER, G.: Brauchbarkeit und Anwendungsbereich der Papierelektrophorese der Serumproteine. Acta chem. Scand. **5**, 1020 (1951). — SCHEIFFARTH, F., u. G. BERG: Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. I. Mitt.: Die Normalwerte bei Ratten und Kaninchen. Z. exper. Med. **119**, 550 (1952). — STÜRMER, K.: Quantitative Mikroelektrophorese von normalem Kaninchenserum. Z. exper. Med. **117**, 359 (1951). — TERBRÜGGEN, A.: Über die seröse Entzündung, parenchymatöse Degeneration und Nekrose auf Grund von quantitativen Eiweißbestimmungen in der Leber. Z. inn. Med. **2**, 710 (1947). — TERBRÜGGEN, A., u. A. DENECKE: Experimenteller Beitrag zum Problem des Kollapses und der serösen Entzündung mit besonderer Berücksichtigung der Leber. Beitr. path. Anat. **109**, 491 (1947). — WALLENIUS, G.: Electrophoretic patterns of cerebrospinal fluid and serum compared in normal and pathological conditions. Acta Soc. Med. Upsal. (Schwed.) **57**, 138 (1952). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel 1947 u. 1952. — WUNDERLY, CH., u. B. CAGIANUT: Electrophorèse de l'humeur aqueuse pathologique. Ann. d'Oculist. **185**, 414 (1952). — WUNDERLY, CH., u. F. WUHRMANN: Kapillar-Permeabilität und Bluteiweißstoffe. Plasma **1**, 27 (1953).

Dr. M. KESSEL, Dr. P. KÖRTGE u. Professor Dr. F. A. PEZOLD,
Medizinische Klinik der Freien Universität Berlin.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. LOESER).

Untersuchungen über das sogenannte Auslöschphänomen bei doppelseitiger Vagusreizung.

Von
H. GENUIT.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. April 1953.)

In einer größeren Arbeit berichtete GREMELS vor einigen Jahren über einige interessante Beobachtungen, die er bei gleichzeitiger Reizung beider N. Vagi machte: Unter gewissen Voraussetzungen, die in den meisten Fällen vorliegen sollen, sah er, daß die Wirkung einer einseitigen Vagusreizung, die sich in bekannter Weise in Herabsetzung der Herzschlagfolge und Blutdrucksenkung äußerte, nicht auftrat, wenn zusätzlich der andere Halsvagus gleichzeitig gereizt wurde. Er nannte diese merkwürdige Erscheinung „Auslöschphänomen“ (A.Ph.) und versuchte, sie unter Anwendung einiger Hilfhypothesen im Rahmen der Vorstellungen über die Potentialstoffwirkungen des Acetylcholins zu erklären.

Schon frühere Untersuchungen von HOFFA, LUDWIG, HÜFLER u. a. hatten gezeigt, daß die zusätzliche Reizung des zweiten Vagus — je nach der Dauer und Intensität, mit der der erste Vagus gereizt wurde — nur gering sein bzw. ganz fehlen konnte. Eine Aufhebung des Reizerfolges war indessen nie beobachtet worden.

Die Voraussetzungen, die gegeben sein müssen, damit das A.Ph. auftritt, erweckten nun Zweifel, ob — bzw. inwieweit — es sich hier um ein wirkliches physiologisches Phänomen handle. Es trat die Vermutung auf, daß die Beobachtungen vielleicht sehr viel einfacher erklärt werden könnten, wenn man annähme, daß infolge besonderer Verhältnisse der Stromverzweigung bei gleichzeitiger Reizung beider Vagi die Stromstärke in jedem von ihnen soweit sinken würde, daß sie wesentlich unter der Reizschwelle läge und damit ohne sichtbare Wirkung bliebe.

Die oben genannten Voraussetzungen für das Zustandekommen des Auslöschphänomens sind kurz formuliert folgende:

1. Es muß ein Unterschied in der Erregbarkeit beider Vagi bestehen, d. h. für etwa gleichstarke Wirkungen auf Pulsfrequenz und Blutdruck ist bei dem einen Vagus eine höhere Stromstärke erforderlich als bei dem anderen.

2. Die Reihenfolge der Reizung muß so sein, daß zunächst der empfindlichere Vagus gereizt wird. Die Zuschaltung des unempfindlicheren — der dann „mit der

gleichen Intensität“ wie der empfindlichere gereizt wird — läßt das A.Ph. in Erscheinung treten.

3. Bei auslösbarem A.Ph. bleibt die gleichzeitige Reizung beider Vagi immer ohne sichtbaren Erfolg.

Diese Angaben sowie die Werte der Reizstromstärken, die nach eigenen orientierenden Versuchen verhältnismäßig hoch erschienen, veranlaßten uns, die elektrischen Vorgänge bei der von GREMELS verwendeten Reizapparatur eingehender zu untersuchen.

Die Angaben im Abschnitt „Methodik“ seiner Arbeit sind leider nicht ganz erschöpfend. Immerhin können im Zusammenhang mit einigen persönlichen Mitteilungen folgende Feststellungen getroffen werden.

a) Die Quelle für den Reizstrom ist ein Schwingkreis (Röhrensummer).

b) Dieser ist in der Einzahl vorhanden. Bei Reizung beider Nerven werden diese parallel geschaltet, so wie man etwa 2 Glühlampen an das Lichtnetz anschließt.

c) Als Reizelektroden dienen in der Längsrichtung geteilte Röhren aus Isoliermaterial, in die 2 Drähte aus V2a Stahl eingeführt sind. Der nicht von den Nerven beanspruchte Raum im Inneren der Röhren wird zur Vermeidung von Austrocknung mit feuchter Watte ausgefüllt.

Für die unter b) gemachten Feststellungen, die wie gesagt aus dem Teil Methodik nicht ganz sicher zu entnehmen sind, spricht unseres Erachtens auch, daß die Benutzung eines gesonderten Schwingkreises für jeden Nerven sicherlich betont worden wäre. Weiterhin kann man als Beweis ansehen, daß bei Reizung beider Vagi stets für beide die gleiche Stromstärke benutzt wurde, und zwar diejenige, die für den empfindlicheren eben oder auch deutlich überschwellig, für den unempfindlicheren aber unterschwellig war. Diese Anordnung wäre völlig unverständlich, wenn für jeden Nerven eine gesonderte Reizapparatur zur Verfügung gestanden hätte.

Wie weiter unten beschrieben werden wird, liegen die Stromstärken, die bei Vermeidung von rein methodisch bedingten Nebenschlüssen benötigt werden, um vom — auch nicht durchtrennten — Vagus aus einen sichtbaren Reizerfolg auszulösen, etwa 2 Zehnerpotenzen niedriger als die in der zitierten Arbeit angegebenen. Es ist also mit Sicherheit anzunehmen, daß der größte Teil des gemessenen Reizstromes durch Nebenschlüsse — eben durch die aufgelegte feuchte Watte — geflossen ist.

Aus den entsprechenden Angaben läßt sich leicht ausrechnen, daß die Nebenschlüsse nicht etwa einen konstanten Wert haben, sondern sich merklich ändern können. Betrachtet man z. B. die Abb. 11a der zitierten Arbeit: Es wird zu zeigen versucht, daß nach einer Gabe von Urethan ein vorher unterschwelliger Reiz nun deutliche Wirkung hat, obwohl eine noch etwas geringere Intensität angewandt wurde. Auffallenderweise betrifft diese Änderung aber nur den einen (den rechten) Vagus. Aus den Angaben über Stromstärke und Spannung (3,1 Volt und 4,6 mA) errechnet sich der Widerstand im Reizkreis (Reizstrecke einschließlich Nebenschlüsse und Milliamperemeter) zu 675 Ohm. Nach Verabreichung von Urethan hingegen sind die Werte 3,1 Volt und 4,0 mA. Der Widerstand beträgt also jetzt 775 Ohm. Das Milliamperemeter — dem Vernehmen nach ein Mavometer — hat im obigen Meßbereich einen Widerstand von 200 Ohm. Der Widerstand Nervenstrecke + Nebenschlüsse ist also vorher 475 Ohm und nachher 575 Ohm. Es hat eine Vergrößerung von etwa 20 % stattgefunden. Das bedeutet, daß offensichtlich die Nebenschlüsse geringer geworden sind. Unter diesen Verhältnissen geht natürlich zwangsweise mehr Strom durch den Nerven, besonders da die Stromstärke nur um 13% gesunken ist. Charakteristischerweise tritt die verstärkte Wirkung

im linken Vagus nicht auf. Hier hat sich aber auch der Widerstand (675 Ohm vorher, 650 Ohm nachher) nicht nennenswert geändert und dazu noch in entgegengesetztem Sinne wie der rechte. Gleichsinnige Widerstandsänderungen lassen sich aus den Angaben der Abb. 3 der Arbeit errechnen. Hier ist die Änderung doppelseitig und ebenso der verstärkte Reizerfolg nach Urethan. Das Bestehen eines physiologischen Problems in der vermuteten Form soll mit dieser Betrachtung noch nicht geleugnet werden. Es sollte jedoch gezeigt werden, welche Unsicherheitsfaktoren in der angewandten Methodik stecken und wie vorsichtig die Auswertung der Versuchsergebnisse zu geschehen hat.

Nach diesen Ausführungen lassen sich unseres Erachtens die unter b) und c) gemachten Feststellungen als weitgehend gesichert ansehen. Darauf aufbauend kann man folgende Überlegungen anstellen, die das A. Ph. rein als Folge von Stromverzweigungen nach den KIRCHHOFFSchen Gesetzen erklären lassen, wie sie unter den gewählten Versuchsbedingungen auftreten mußten.

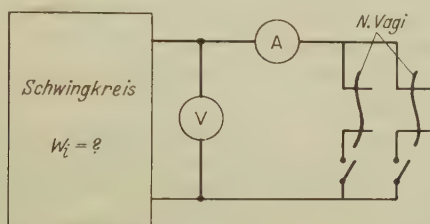


Abb. 1.

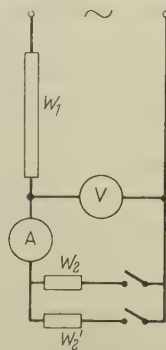


Abb. 2.

Abb. 1. Schwingkreis mit eingeschaltetem Volt- und Amperemeter.

Abb. 2. Schaltskizze. W_1 versinnbildlicht den inneren Widerstand des Schwingkreises. — W_2 und W_2' stellen die im Verhältnis zu W_1 kleinen Widerstände der Reizstrecke dar.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für den inneren Aufbau eines Schwingkreises. Darauf braucht hier nicht näher eingegangen zu werden. Welche Schaltungsmöglichkeit aber auch gewählt wurde, immer hat man in einem Schwingkreis einen Wechselstromerzeuger mit beträchtlichem inneren Widerstand (W_i) vor sich. Das bedeutet, daß er belastungsabhängig ist. Es ist also nicht so wie beim Lichtnetz mit praktisch unendlich kleinem inneren Widerstand. Hier ändert sich die Spannung kaum, ob nun ein oder zwei Verbraucher (z. B. Glühlampen) angeschaltet werden. Durch die zuerst eingeschaltete fließt auch nach Zuschaltung der zweiten der Strom weiter in der gleichen Stärke. Beim Schwingkreis hingegen muß angenommen werden, daß bei Zuschaltung des zweiten Nerven der Spannungsabfall an der Reizstrecke kleiner wird und damit auch die Stromstärke in jedem einzelnen Nerven sinkt. Diese Tendenz wird noch verstärkt durch das eingeschaltete Milliampereometer mit seinem im Verhältnis zur Reizstrecke beträchtlichen Widerstand. Zudem wird ja auch nicht der Spannungsabfall an der Reizstrecke selbst, sondern an der Strecke Milliampereometer + Reizstrecke gemessen. Die Möglichkeit einer Täuschung über die wahre Stromstärke in den einzelnen Nerven ist damit noch größer. Merkwürdigerweise fehlen in allen Versuchen mit doppelseitiger Reizung die Angaben über die Spannung. Sei es nun, daß das Sinken der Spannung nicht bemerkt wurde, sei es, daß die Tatsache als nicht bemerkenswert angesehen wurde, so liegt doch wahrscheinlich gerade hier der Schwerpunkt für die Beobachtung über das Auslöschphänomen.

Das Prinzipielle, auf das es ankommt, läßt sich demnach in Abb. 2 vereinfacht darstellen.

Bei einer gegebenen Spannung der Stromquelle wird also die Stromstärke wesentlich durch W_1 + Widerstand des Milliampereometers bestimmt, da W_2 bzw. W_2' nur einen Bruchteil des Gesamtwiderstandes ausmachen. Daraus folgt, daß bei Parallelschaltung der beiden Widerstände W_2 und W_2' sich die Gesamtstromstärke nur wenig — eventuell kaum meßbar — zu ändern braucht. (Die Größe der Änderung ist von dem Verhältnis der Widerstände abhängig.) Wahrscheinlich ist von diesem Blickpunkt aus die Angabe zu verstehen, daß bei doppelseitiger Reizung der zweite Vagus „mit der gleichen Intensität“ wie der erste mitgereizt wird. Der beinahe gleichgroße Strom verzweigt sich also über die Wege W_2 und W_2' . Da diese Widerstände etwa gleichgroß sind, sinkt in ihnen die Stromstärke auf etwa die Hälfte und wird damit unterschwellig. Der Grad der Unterschwelligkeit — wenn man so sagen darf — wird dann, wenn man eine nur für den empfindlicheren Nerven überschwellige Gesamtstromstärke verwandte, offenbar so groß, daß auch die Reizung beider Vagi keinen sichtbaren Erfolg mehr hat — es tritt das sogenannte Auslöschphänomen auf.

Die Abb. 8 b der zitierten Arbeit bietet einen starken Hinweis in dieser Richtung. Es wird dort gezeigt, daß die Wirkung von Acetylcholin — intravenös injiziert — unmittelbar im Anschluß an einen unterschwelligen einseitigen Vagusreiz stärker ist als vorher. Genau dasselbe sieht man bei doppelseitiger Reizung und positivem Auslöschphänomen (vgl. S. 381, Abb. 13). Bei unvoreingenommener Betrachtung müßte man doch wohl annehmen, daß in beiden Fällen eine unterschwellige Reizung vorlag, die die Acetylcholinwirkung jedesmal in gleicher Weise veränderte.

Weiter unten wird gezeigt werden, daß auch für beide Vagi unterschwellige Reize bei gleichzeitiger Reizung durchaus eine sichtbare Wirkung haben können, wenn eben die Stromstärken in den beiden Vagi nicht zu tief unter der Schwelle liegen. Dies ist offenbar der Fall bei den von GREMELS in einem Teil der durchgeführten doppelseitigen Reizungen beobachteten geringeren Abschwächungen oder sogar Verstärkungen, die — in unserem Sinne erwartungsgemäß — dann auftraten, wenn die Reizschwellen etwa gleich waren.

Soweit handelt es sich um Überlegungen, die, wenn sie unseres Erachtens auch gut begründet erscheinen, damit noch nicht bewiesen sind. Als Beweis müßte gezeigt werden, daß immer dann, wenn bei doppelseitiger Vagusreizung in den einzelnen Reizstrecken der bei Einzelreizung für den Erfolg notwendige Strom fließt, das Auslöschphänomen ausbleibt, während es im gleichen Versuch in einer Schaltung nach Abb. 2 auftritt. Die hierzu angestellten Versuche werden nachstehend beschrieben.

Methodik.

Versuchstiere waren ausgewachsene Katzen, denen in leichter Äthernarkose 70–90 mg/kg Chloralose in die Vena jugularis infundiert wurde. Blutdruckregistrierung mittels Quecksilbermanometer und Gegenstromapparat eigener Konstruktion* von der A. femoralis aus. Registrierung der Pulsfrequenz mit Hilfe eines

* z. Zt. im Druck.

von GENUIT angegebenen Ordinatenschreibers*. Die Steuerung des Ordinatenschreibers erfolgte durch eine von demselben Autor entwickelte Kontaktvorrichtung im aufsteigenden Schenkel des Manometers*. Dadurch wurde eine Eröffnung des Brustkorbes und künstliche Atmung überflüssig, zumal die Beobachtung von Überleitungsstörungen durch Vergleich der Vorhof- und Kammerfrequenz für unsere Fragestellung unwichtig erschien. Bei den Reizelektroden wurde Wert darauf gelegt, Nebenschlüsse zu vermeiden. Zu diesem Zwecke wurde eine Elektrode mit fünf kleinen Kammern entwickelt (vgl. Abb. 3), die in der skizzierten Weise neben der Trachea angebracht wurde. Als Material wurde das in der Zahnprothetik übliche Paladon benutzt.

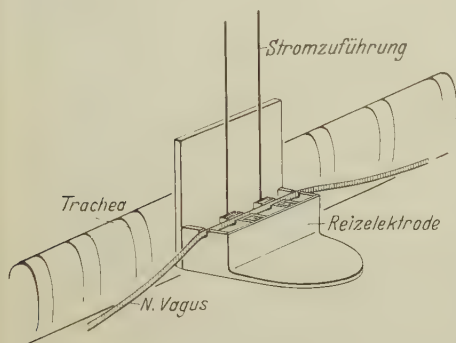


Abb. 3. Reizelektrode.

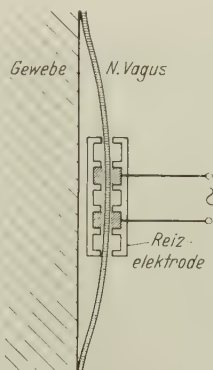


Abb. 4. Schematische Darstellung zur Veranschaulichung des anatomisch bedingten Nebenschlusses.

Die Stromzuführung mittels Platindraht erfolgt in die jeweils zweite Kammer von außen. Diese wurde mit Zellstoff, der mit 0,9% NaCl-Lösung befeuchtet war, gefüllt. In den Oberrand der Kammertrennwände wurde in Verlaufsrichtung des Nerven eine Rinne gesägt. Der feuchte Zellstoff wurde entsprechend dieser Rinne in den beiden Kammern modelliert. Infolge dieser Anordnung muß der Nerv sowohl zwischen den beiden Stromzuführungen wie auch zwischen Eintritt in die Elektrode und 1. Stromzuführung sowie zwischen 2. Stromzuführung und Austritt aus der Elektrode je eine leere Kammer durchlaufen. Durch die waagerechte Platte der Elektrode wird gleichzeitig die Halsmuskulatur abgedrängt. Die einzige Gefahr der Entstehung von Nebenschlüssen besteht in durch zu starke Befeuchtung des Zellstoffs bedingtem Volllaufen der anderen Kammern. Dies kann jedoch leicht vermieden werden. Nicht vermieden werden kann ein Nebenschluß, der bei nicht durchschnittenem Vagus durch die anatomischen Verhältnisse bedingt ist (vgl. Abb. 4). Bei Anlegen einer Spannung an die Zuleitungen einer Reizelektrode fließt ein Strom in dem Nervenstück, das zwischen den beiden Zuführungen liegt. Aber nicht nur dort, sondern auch durch das freipräparierte Stück des Nerven, das zentral bzw. peripher davon liegt. Diese sind ja untereinander durch das gut leitende Körpergewebe verbunden.

Der in diesen Strecken fließende Strom verhält sich zu dem Strom, der durch das zwischen den Zuführungen liegende Stück fließt, wie die Längen der durchflossenen Strecken. In unserer Anordnung ist das Verhältnis offensichtlich 1:4 oder größer. Es ist in gewissen Grenzen variabel. Dies hängt von der Länge der Strecke ab, die der Nerv vor Eintritt in bzw. nach Austritt aus der Elektrode frei bis zur Berührung mit dem Körpergewebe verläuft. Die Bedeutung dieses Nebenschlusses

* z. Zt. im Druck.

zu untersuchen ist sicherlich von Interesse, besonders da die Richtung des in ihm fließenden Stromes der des Stromes in der Strecke zwischen den Zuführungen entgegengesetzt ist. Vielleicht liegt hier auch ein Ansatzpunkt für eine exakte Untersuchung über das Sinken der Reizschwelle nach Vagusdurchschneidung. Es ist nämlich anzunehmen, daß bei Reizelektroden, die mit feuchter Watte ausgefüllt sind und die an ihren Enden vermutlich Flüssigkeitsbrücken zum Gewebe haben, prozentual sehr viel mehr Strom durch diesen Nebenschluß geht als in unserer Anordnung. Bei Manipulationen an einem Ende der Reizelektrode (Vagusdurch-

schneidung) wird dieser Nebenschluß mit hoher Wahrscheinlichkeit verringert werden. Bei gleicher am Amperemeter angezeigten Stromstärke kann dann sehr viel mehr Strom durch die eigentliche Reizstrecke fließen, bzw. bei geringerer angezeigter Stromstärke ein sichtbarer Erfolg auftreten und damit ein Absinken der Reizschwelle vorgetäuscht werden.

Es ist anzunehmen, daß der Nerv in unserer Elektrode einer Austrocknung mehr ausgesetzt ist als bei Einhüllung in feuchte Watte. Ein Nachteil, erkennbar an einem Verlust der Erregbarkeit, wurde jedoch nie beobachtet.

Die Reizapparatur sollte es ermöglichen, jeden Nerven einzeln mit veränderlicher Stromstärke zu reizen. Bei gleichzeitiger Reizung sollte garantiert sein, daß in jedem Nerven die vorher bei Einzelreizung erprobten Stromstärken auch wirklich erreicht wurden. Außerdem sollte die Möglichkeit bestehen, die Verhältnisse, die vermutungsweise das A.Ph. bewirkt hatten, nachzuahmen. Die in Abb. 5 wiedergegebene Schaltung entspricht diesen Anforderungen. Da Unterschiede in der Wirkung verschiedener Frequenzen

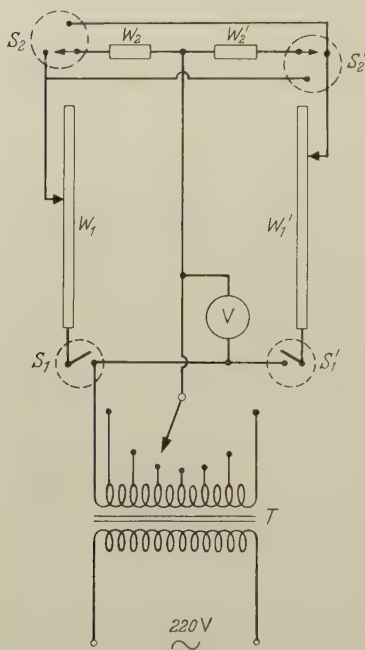


Abb. 5. Reizapparatur.

in diesem Zusammenhang nicht interessierten, wurden 50 Hertz gewählt, die dem optimalen Frequenzbereich von 25 bis 40 Hertz sehr nahe liegen und dem Wechselstromnetz entnommen werden können.

Da die Elektroden nicht unpolarisierbar sind, ist mit Widerstandsänderungen zu rechnen. Um diese in Hinsicht auf die erzielten Stromstärken unwirksam zu machen, wurde in jede Reizleitung ein hochohmiger Widerstand gelegt, dessen Wert das Vielfache des Widerstandes der Reizstrecke betrug. Dies hat den weiteren Vorteil, daß damit die Ähnlichkeit mit der Anordnung von GREMELS hergestellt und außerdem die Messung der Stromstärken erleichtert wird. Es zeigte sich, daß bei Vermeidung der Nebenschlüsse Stromstärken von nur größenordnungsmäßig 1/100 bis 1/20 mA erforderlich sind. Wechselströme dieser Größe zu messen ist schwierig. Jedenfalls standen die dafür notwendigen Meßinstrumente nicht zur Verfügung. Sehr viel einfacher ist es, die angelegte Spannung zu messen. Bei Benutzung bekannter Widerstände für W_1 und W_1' , die so groß sein mußten, daß W_2 bzw. W_2' nur wenige Prozent davon ausmachten, konnte die Stromstärke aus Spannung und W_1 unter Vernachlässigung von W_2 hinreichend genau berechnet werden.

Es bestanden nun zwei Möglichkeiten, die Stromstärke zu variieren. Einmal konnte man W_1 und W_1' konstant halten und die Spannung für jede Reizstrecke mittels Potentiometer einstellen. Zweitens war es möglich, beide Reizstrecken an dieselbe Spannung zu legen. Die Stromstärken konnten dann durch Änderung von W_1 bzw. W_1' bewirkt werden. Um vorhandene Geräte auszunutzen, wurde diese zweite Möglichkeit gewählt. Einschaltung erfolgt jeweils durch die Schalter S_1 oder S_1' . Durch Betätigung der Umschalter S_2 und S_2' kann entweder bei Reizung von W_2 W_2' dazu parallel geschaltet werden oder umgekehrt.

Versuchsergebnisse.

Um möglichst durchsichtige Versuchsbedingungen zu haben, wurde zunächst der Fall untersucht, in dem die Reizung von jedem Vagus aus eine deutlich sichtbare Wirkung auf Blutdruckhöhe und Pulsfrequenz hatte. Zu bemerken ist dabei, daß die Stromstärken, die notwendig waren, um vom linken bzw. rechten Vagus aus etwa gleichstarke Wirkungen zu erzielen, in allen Fällen verschieden waren. Damit war eine Vorbedingung, die für das Zustandekommen des A.Ph. erfüllt sein sollte, immer gegeben.

In Abb. 6 ist ein derartiger Versuch wiedergegeben. Die Wirkung vom rechten Vagus aus ist hier stärker als vom linken. Dies ist ohne Bedeutung, da auch dann, wenn bei entsprechender Einstellung der Reizstromstärken die Verhältnisse umgekehrt lagen, die Ergebnisse dieselben blieben.

Die *erste* gleichzeitige Reizung beider Vagi zeigt eine erheblich stärkere Wirkung als jede der Einzelreizungen. Die in den Reizstrecken fließenden Ströme hatten in diesem Fall die gleiche Stärke wie bei der Einzelreizung.

Im Gegensatz dazu steht die Wirkung der *zweiten* doppelseitigen Reizung. Der Schaltung entsprechend muß dabei in jedem Nerven die Stromstärke erheblich sinken. Entsprechend bleibt auch eine sichtbare Wirkung aus (A.Ph.). In einer Reihe von Kontrollversuchen, bei denen die Stärke der Einzelreizungen variiert wurde, zeigte sich immer wieder das gleiche Bild. Dabei ergab es sich fast von selbst, daß auch untersucht wurde, wie nun eine unterschwellige Reizung von einem Vagus aus eine überschwellige vom anderen aus beeinflussen würde.

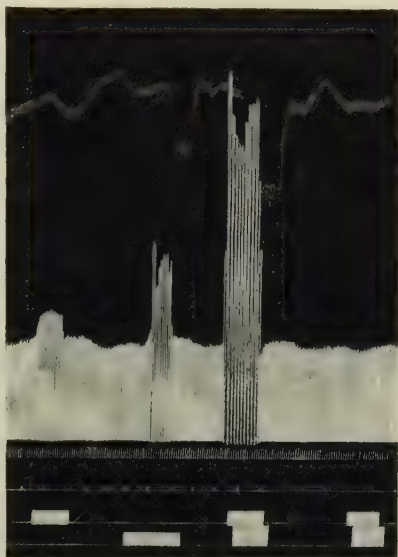


Abb. 6. Einzelreizung beider Vagi und doppelseitige Reizung. — Das oberste Signal markiert auf den Abbildungen jede Sekunde, das zweite Signal jede 10. sec, das dritte die Reizdauer des li., das vierte die des re. Vagus.

Die Abb. 7 zeigt einen typischen Versuch dieser Serie. Die Reizung des rechten Vagus ist überschwellig, die des linken unterschwellig. Die gleichzeitige Reizung beider Nerven mit den gleichen Stromstärken wie vorher ergibt eine erhebliche Verstärkung. Die zweite doppelseitige Reizung zeigt erwartungsgemäß das A.Ph.

Ein Schritt weiter führte zur gleichzeitigen Anwendung zweier unterschwelliger Reize. Wie Abb. 8 zeigt, kann es dabei zu einer kräftigen



Abb. 7. Kombination von unter- und überschwelligen Reizen.



Abb. 8. Kombination zweier unterschwelliger Reize.

Wirkung kommen, wenn die Stromstärken nicht zu weit unterhalb der Schwelle liegen. Daß es hier eine Grenze gibt, bei deren Unterschreitung auch die doppelseitige Reizung keine sichtbare Wirkung mehr erzielt, beweist das Auftreten des A.Ph. in unseren Versuchen. Die Abb. 8 beweist nebenher, daß das Ausbleiben der sichtbaren Wirkung bei der zweiten doppelseitigen Reizung nicht etwa darauf beruht, daß die Nerven inzwischen unerregbar geworden sind. Die dritte doppelseitige Reizung in der gleichen Schaltung wie die erste ergibt auch wieder die gleiche Wirkung.

Ein Einwand, der in Anbetracht des in allen Abbildungen so prompt auftretenden A.Ph. gemacht werden könnte, wäre der, daß vielleicht bei der zweiten doppelseitigen Vagusreizung kein Strom geflossen ist. Ab-

gesehen davon, daß natürlich im Modellversuch die Schaltung überprüft wurde, zeigt auch der Versuch in Abb. 9, daß Strom geflossen ist. Hier tritt keine völlige Aufhebung der Wirkung ein, sondern nur eine Abschwächung, eine Beobachtung, die auch GREMELS in einem Teil seiner Versuche machte.

Es ist zu erwarten, daß sich bei fortlaufender Verkleinerung des Widerstandes W_1 (bei Reizung entsprechend der Schaltung nach Abb. 2) alle Übergänge von völliger Auslöschung über Abschwächung bis zu mehr oder weniger deutlicher Verstärkung bei doppelseitiger Reizung erzielen lassen. Um bei einer solchen Verkleinerung von W_1 keine zu hohen Reizstärken zu erhalten, wäre es notwendig gewesen, die Spannung unter 2 Volt zu senken. Das war uns mit der bei Ausführung der Versuche zur Verfügung stehenden Apparatur nicht möglich. Außerdem schien uns die Antwort auf die Frage, ob das A.Ph. ein physiologisches Problem sei oder nicht, durch die übrigen Ergebnisse hinreichend klar gegeben.

Die Beobachtungen bei Anwendung unterschwelliger Reize hat hinsichtlich der Anschauung über den Grad der Verstärkung, die bei doppelseitiger Reizung gegenüber der einseitigen auftritt, eine besondere Bedeutung. Viele Untersucher geben an, daß durch zusätzliche Reizung des zweiten Vagus nur eine verhältnismäßig geringe Verstärkung der durch einseitige Reizung erzielten Wirkung zustande kommt.

Teilweise wird der Grad der Verstärkung sogar in Prozent angegeben. Es erscheint uns nun nicht gut möglich, hier eine sichere Basis für prozentuale Berechnungen zu finden. Natürlich kann man — ausgehend von einem gut überschwelligen Reiz — die durch diesen hervorgerufene Blutdrucksenkung oder Pulsverlangsamung als Ausgangspunkt wählen. Dies ist aber doch ein sehr willkürlicher Maßstab, der dann sofort seine Anwendbarkeit verliert, wenn es sich um die Kombination unterschwelliger Reize handelt. Im übrigen wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit bei früheren Untersuchern die Belastungsabhängigkeit der Reizapparaturen ähnlich wie bei der Erzeugung des A.Ph. eine Rolle gespielt hat.

Nach unseren Ergebnissen kann man hinsichtlich des Verhältnisses der einseitigen zur doppelseitigen Vagusreizung folgendes sagen: Bei maximalen Reizungen tritt eine Verstärkung nur hinsichtlich der Wirkungsdauer auf. Bei Abnahme der Reizstärke bis hinunter zu unterschwelligem Reizen tritt eine mit Abnahme des Erfolgs der einseitigen



Abb. 9. Unvollständiges Auslöschphänomen.

Reizung immer stärker in Erscheinung tretende Verstärkung bei doppelseitiger Reizung auf. Selbst bei unter-schwelligen Einzelreizen kann die doppel-seitige Reizung noch bis zur maximalen Wirkung kommen.

Bei weiterer Senkung der Stromstärken wird der Erfolg doppel-seitiger Reizung submaximal und sinkt entsprechend den Stromstärken bis auf Null.

Zusammenfassung.

Doppelseitige Vagusreizung ist immer stärker wirksam als einseitige Reizung. Auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse wird die Existenz eines „Auslöschphänomens“ abgelehnt.

Literatur.

ASCHER, L.: Handbuch d. norm. u. path. Physiolog., Berlin 1926, Bd. VIII, S. 406. — GANTER, G., u. A. ZAHN: Pflügers Arch. **154**, 492. (1913). — GREMELS, H.: Aepp. **179**, 360 (1935). — HOFFA, M., u. C. LUDWIG: Zeitschr. f. rat. Med. Heidelberg **9**, 116 (1850). — HÜFLER, E.: Du Bois Arch. f. Physiol. Braunschweig 1909, S. 263. — TIGERSTEDT, R.: Die Physiologie des Kreislaufs. Berlin u. Leipzig 1921, Bd. 2 S. 338. — WEBER, Ed.: Handwörterbuch der Physiol. **3**, 45 (1876).

Doz. med. habil. H. GENUIT, Hamm (Westf.), Viktoriapl. 12.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. SCHOEN).

Die Messung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens am gesunden Menschen vor und nach Digitoxin*.

Von

ROSEMARIE KOCH und MAX SCHWAB.

(Eingegangen am 20. August 1953.)

Im Jahre 1947 teilten HANDLEY und TELFORD Untersuchungen über das Plasma- und extracelluläre Flüssigkeitsvolumen (e.F.) bei Hunden im Anschluß an Digitalisgaben mit.

Die Autoren verwandten 0,3—0,6 ml/kg einer Digitalistinktur, welche 1 USP XII Einheit/ml enthielt. Die Bestimmung des extracellulären Raumes geschah mit Hilfe der Thiocyanatmethode. Dabei fand sich im Anschluß an die Digitalisapplikation eine Abnahme des Plasmavolumens, ein Anstieg des Hämatokritwertes und eine Vergrößerung des Thiocyanatraumes. Da nun die Zunahme der interstitiellen Flüssigkeit (e. F. — Plasmavolumen) weit größer war als die Abnahme des Plasmavolumens, schlossen die Autoren auf eine Abwanderung von Flüssigkeit aus den Zellen in den interstitiellen Raum. Am deutlichsten schien dieser Effekt innerhalb von 4—8 Std nach Digitalisapplikation ausgeprägt zu sein. In einigen Fällen bestand der Effekt über 3—4 Tage fort. CHAPMAN u. HANDLEY berichteten 1949 über ergänzende Tierversuche mit i.v. Digitoxin- bzw. Digoxinapplikation. Mit EVANS Blau wurde in 4—10 stündigen Intervallen das Plasmavolumen, mit Thiocyanat das e. F. bestimmt. Außerdem wurden die Elektrolyte Natrium und Kalium untersucht und Elektrokardiogramme geschrieben. Es ergab sich, daß Digitalis in niedrigen Dosen kaum Veränderungen der erwähnten Meßgrößen hervorrief. Dagegen fanden sich bei hohen Dosen die von der Digitalisüberdosierung her bekannten EKG-Veränderungen, ein Anstieg des Hämatokritwertes, eine Verminderung des Plasmavolumens und eine Vergrößerung des Thiocyanatraumes.

In Anbetracht dieser im Tierversuch und mit hoher Dosierung gewonnenen Befunde war es von Interesse, ob sich ähnliche Veränderungen auch mit therapeutischer Digitalismedikation am Menschen feststellen ließen.

Methodisches.

Die eben genannte *Thiocyanatmethode* ist nach neueren Untersuchungen nur bedingt zur exakten Bestimmung des e. F. geeignet. Dringt doch Thiocyanat schon beim gesunden Organismus in die Zellen bestimmter Gewebe und Organe, z. B. Erythrocyten und Magenschleimhaut, ein (LEVITT u. GAUDINO). Im pathologisch veränderten Organismus scheint die Permeabilität der Zellen für das Thiocyanation noch größer zu sein, so daß in diesen Fällen die Verwendung der Thiocyanatmethode eher einer Bestimmung des Totalwassergehaltes gleichkommt

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

(OVERMAN; OVERMAN u. FELDMAN). Ein für die Bestimmung des e. F. ideal geeigneter Stoff muß dagegen eine ausschließliche und gleichmäßige Verteilung im Extracellulärraum zeigen, ohne dabei einen spezifischen Einfluß auf die Wasserverteilung selbst auszuüben. Er darf außerdem nicht in den Stoffwechsel eingehen, soll keine toxischen Wirkungen entfalten und die Möglichkeit leichter und genauer Bestimmung bieten. Das extracelluläre Volumen errechnet sich unter diesen Bedingungen bei Kenntnis der Plasmakonzentration und der Gesamtmenge der verteilten Testsubstanz wie folgt:

$$V = Z/C$$

(V = e. F., Z = Gesamtmenge der Testsubstanz, C = Plasmakonzentration). Mehrfach wurden die körpereigenen Elektrolyte *Natrium* und *Chlorid* verwendet, wobei ihre radioaktiven Isotope zur Feststellung des Gesamtgehaltes an Natrium und Chlorid dienten. Jedoch haben neueste Untersuchungen gezeigt, daß entgegen früheren Annahmen nicht unbeträchtliche Mengen von Natrium und Chlorid intracellulär gelagert sind (DEANE u. SMITH; DEANE, ZIFF u. SMITH).

Auch *Bromid* und *Sulfat* zeigen gewisse Nachteile. Dabei sind gegen Bromid dieselben Einwände wie gegen Chlorid geltend zu machen, da Bromid eine in Körperflüssigkeiten und Körperzellen mit Chlorid identische Verteilung zeigt. Die gegen Sulfat vorgebrachten Bedenken scheinen allerdings bei Verwendung von *Radiosulfat* (WALSER, SELDIN, GROLLMAN) ohne Bedeutung zu sein.

Bei Verwendung der Kohlehydrate *Rohrzucker*, *Mannit* und *Inulin* dagegen werden die vorgenannten Fehlerquellen weitgehend vermieden. Von ihnen bietet das Inulin einige grundsätzliche Vorzüge. Es besitzt ein hohes Molekulargewicht (um 5100), ist lipoidunlöslich und osmotisch praktisch unwirksam. Außerdem liegt kein Anhalt für seinen Abbau im Organismus vor. Ein großer Nachteil ist allerdings die rasche glomeruläre Ausscheidung. Um trotzdem eine gleichmäßige Verteilung im extracellulären Raum zu erreichen, ist daher eine dauernde Zufuhr erforderlich (GAUDINO u. LEVITT; SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL). Untersuchungen der letzten Zeit legen zwar nahe, daß der so mit Inulin bestimmte extracelluläre Raum weniger anatomisch als funktionell abzugrenzen ist; werden doch wahrscheinlich Knochen- und Sehngewebe wegen ihres sehr langsamen Flüssigkeitsaustausches mit dem Plasma nur unvollständig erfaßt. Die vergleichenden Untersuchungen des e. F. mit Rohrzucker (DEANE, SCHREINER u. ROBERTSON), Mannit (SCHWARTZ, BREED u. MAXWELL), Ferrocyanid (CALCAGNO, HUSSON u. RUBIN) sowie Radiosulfat (WALSER, SELDIN u. GROLLMAN) zeigen so gute Übereinstimmung mit dem Inulinraum, daß man zu der Annahme einer wenigstens funktionell wohl umschriebenen Flüssigkeitsphase berechtigt ist.

Leider eignet sich die Inulinmethode nicht für die Messung des e. F. bei Ödemkranken, also z. B. bei Herzinsuffizienz. Ist doch dann selbst nach 30 stündiger Dauerinfusion noch keine gleichmäßige Verteilung im extracellulären Raum, besonders beim Vorliegen von Körperhöhlenergüssen, gegeben. *Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher nur an herzgesunden Versuchspersonen (Vpn.) durchgeführt.*

Im einzelnen wurde in Anlehnung an SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL folgendermaßen vorgegangen. 10 gesunde weibliche Vpn. dienten als Kontrollgruppe. Es wurde bei ihnen 2mal, im Abstand von 3 Tagen, eine Bestimmung des e. F. durchgeführt. Bei einer 2. Gruppe von 9 weiblichen Vpn. wurde im Anschluß an die 1. Bestimmung 2,2 mg Digitoxin (1. Tag 0,8; 2. Tag 0,8; 3. Tag 0,6 mg) per os gegeben. Nur in wenigen Ausnahmefällen (Vpn. H. G. und G. St.) wurde Digitoxin in entsprechenden Dosen i.m. injiziert. Eine besondere Vorbereitung der Vpn. fand nicht statt.

Mit Ausnahme der Vpn. R. E. und E. F., welche 15 g erhielten, wurden stets 25 g Inulin gegeben. Dabei wurden 5 g (1 Ampulle der von den Fa. Laevosan-Linz und Deutsche Laevosan-Gesellschaft-Mannheim gelieferten 10% Lösung) als i.v.

Erstinjektion, der Rest in Verdünnung mit steriler isotonischer Kochsalz- bzw. RINGER-Lösung als i.v. Dauertropfinfusion zugeführt. Die Dauer dieser Infusion betrug bei allen Vpn. 6 Std, wird doch von SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL bereits nach 5 Std eine gleichmäßige Verteilung auf den extracellulären Raum angegeben. Als Infusionsgerät wurde die von HOFFMANN u. WITTE entwickelte Apparatur verwendet. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 1,0–1,1 ml/min. Mit Hilfe von Blut- und Urinproben vor Beginn der Infusion wurden die Leerwerte ermittelt. Die Blutentnahmen zur Bestimmung der erreichten Plasmakonzentration erfolgten 5, 5½ und 6 Std nach Beginn der Dauerinfusion. Im Anschluß an die letzte Blutentnahme wurde die Blase katheterisiert, mit Kochsalzlösung gespült und durch Einbringen von Luft vollständig entleert. Gleichzeitig erfolgte die Unterbrechung der Infusion. Von diesem Zeitpunkt an wurde der Harn über 20–22 Std gesammelt, um die gesamte im Augenblick des Stops der Dauerinfusion im extracellulären Raum befindliche Inulinmenge bestimmen zu können. Durch die Blasenentleerung wird der „Totraum“ — der von der Glomerulusmembran einerseits und der Einmündungsstelle der Ureteren in die Blase andererseits begrenzte Raum — selbstverständlich nicht mit entleert. Grundsätzlich müßte jedoch die in diesem Totraum enthaltene Inulinmenge von der insgesamt nach Stop der Dauerinfusion ausgeschiedenen abgezogen werden. Da dies nicht ohne weiteres möglich ist, wird der dadurch bedingte Fehler — zu hohe Bestimmung des e. F. — dann klein gehalten werden können, wenn die im Totraum vorhandene Inulinkonzentration möglichst gering ist. Dies kann durch eine Erhöhung des Urinflusses erreicht werden. Es wurden daher 1 Std vor Schluß der Untersuchung 300–500 ml Flüssigkeit verabreicht.

Die *Inulinbestimmung* wurde nach den Angaben von DEUTSCH mit geringen Modifikationen (DOERING, SCHROETER, SCHUBERT, SCHWAB) durchgeführt.

Für die *Berechnung des e. F.* wurde stets die Plasmainulinkonzentration der letzten Blutentnahme, also nach 6 Std Dauerinfusion, zugrunde gelegt und in Übereinstimmung mit SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL auf einen Plasmawassergehalt von 94% korrigiert. Die Plasmainulinkonzentrationen nach 5 Std Dauertropfinfusion zeigten im allgemeinen niedrigere Werte als die entsprechenden nach 6stündiger Inulinzufuhr. Der Mittelwert der Quotienten von 5/6 Std-Wert lag mit $1,012 \pm 0,005$ (Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler) denn auch außerhalb des Zufallsbereiches: Bei einem P von 0,035 war seine Abweichung vom idealen Quotienten 1,0 schwach signifikant, so daß die Annahme einer vollständigen Verteilung des Inulins bereits nach 5stündiger Dauerinfusion zweifelhaft erscheint.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit besteht bei der Zuordnung des „richtigen“ *Urinleerwertes*. An sich müßte die in dem inulinhaltigen Sammelharn enthaltene Menge an Inulinoid (Nicht-Inulinsubstanzen, welche gleiche Farbreaktion geben) als Leerwert in Abzug gebracht werden. Diese Möglichkeit schien nach den Arbeiten von HUBBARD u. LOOMIS gegeben. Die Autoren führten die Farbbildung im Leerharn mit der Resorcinmethode auf 2 parallele Teilreaktionen zurück, nämlich Inulinoid des Harns und Resorcin einerseits sowie Inulinoid und Salzsäure andererseits. Die Farbbildung durch die erstgenannte Reaktion sollte nach Angabe von HUBBARD u. LOOMIS bei der üblichen Verdünnung des Harns (1:100) unmeßbar gering sein, so daß die Möglichkeit der Inulinoidkonzentrationsbestimmung in inulinhaltigem Sammelharn aus dem Reaktionsansatz ohne Resorcin bestanden hätte. In 54 Vergleichsuntersuchungen an Leerurinen im Ansatz mit und ohne Resorcin konnten diese Angaben jedoch nicht bestätigt werden. Der mittlere Quotient dieser Bestimmungen lag mit $7,01 \pm 1,007$ weit über dem idealen Quotienten 1,0; seine Abweichung war hoch signifikant, so daß diese Möglichkeit der „richtigen“ *Urinleerwertbestimmung* nicht gegeben war.

SCHWARTZ, SCHACHTER u. FREINKEL ermittelten die Inulinidausscheidung während der Zeit der Sammelperiode aus einer vor der Inulinzufuhr entnommenen zeitlich begrenzten Urinprobe durch Umrechnung auf 20 bzw. 22 Std. Dieses Verfahren ist aber nur unter der Voraussetzung zulässig, daß die Inulinidausscheidung (mg/min) zu verschiedenen Tageszeiten und an verschiedenen Tagen bei derselben Vp. konstant ist. Dies konnte jedoch in eigenen Untersuchungen an 19 Vpn. und 54 Ausscheidungsraten nicht bestätigt werden. Aus durchschnittlich 30 min dauernden Kurzperioden und etwa 20stündigen Sammelperioden wurde die mittlere Inulinidausscheidung/min errechnet. Der Mittelwert der aus dem Vergleich von Kurz-/Langperioden gebildeten Quotienten lag bei 2,366 mit einem mittleren Fehler von $\pm 0,474$. Aus vorliegenden Gründen erscheint die exakte Bestimmung der Inulinidmenge im Sammelharn demnach unmöglich. Es wurde deshalb aus den Einzeluntersuchungen eine mittlere Inulinidausscheidungsrate gewonnen, auf die Zeit der Harnsammelperiode umgerechnet und dieser Mittelwert — 0,17 g/20 Std — in Abzug gebracht.

Die *statistische Auswertung* erfolgte mit dem FISHERSchen t-Test und der Varianzanalyse.

Versuchsergebnisse.

Die an 10 gesunden als Kontrollgruppe dienenden Vpn. gewonnenen Meßwerte des e.F. sind in Tab. 1 wiedergegeben. Als Mittelwert fanden sich bei der 1. Bestimmung 179,8 ml/kg, also rund 18% des Körper-

Tabelle 1. *Extracelluläres Flüssigkeitsvolumen bei 10 gesunden weiblichen Vpn. Doppelbestimmung im Abstand von 3 Tagen.*

Nr.	Name	Alter	Größe m	Gewicht kg	Extracelluläres Volumen	
					Liter	% des Körper- gewichtes
1	R. E.	18	1,78	1. 83,2	12,8	15,38
				2. 83,2	11,05	13,30
2	E. F.	28	1,64	1. 54,3	12,7	23,4
				2. 54,3	13,72	25,3
3	A. S.	43	1,50	1. 51,5	8,1	15,72
				2. 51,3	8,73	17,0
4	v. d. H.	16	1,64	1. 52,5	7,63	14,51
				2. 54,0	6,96	12,9
5	A. G.	28	1,54	1. 50,0	8,14	16,28
				2. 50,0	9,84	19,68
6	I. G.	19	1,56	1. 51,3	7,91	15,42
				2. 51,3	7,68	14,97
7	I. K.	29	1,63	1. 57,5	9,36	16,30
				2. 58,3	11,65	19,96
8	M. S.	21	1,58	1. 49,2	11,18	22,75
				2. 49,9	11,21	22,50
9	H. G.	33	1,52	1. 50,0	10,33	20,7
				2. 50,8	9,8	19,25
10	C. H.	25	1,55	1. 48,0	9,28	19,31
				2. 48,0	11,61	24,27

gewichtetes. Bei der 2. Bestimmung betrugen die Werte 189,06 ml/kg bzw. 18,9% des Körpergewichtes. Die Betrachtung der Einzelwerte zeigt, daß im allgemeinen eine befriedigende Übereinstimmung der Doppelbestimmungen besteht. Allerdings weisen die Vpn. R.E., I.K. und Ch.H. relativ große Unterschiede auf. Das zu Tab. 1 gehörige Varianzschema (Tab. 1a), welchem eine Gliederung nach Vpn. und 1. und 2. Messung zu Grunde liegt, ergibt einen hoch signifikanten Einfluß der Vpn. Daraus geht hervor, daß sich auch durch Bezug auf kg Körpergewicht die vorhandenen individuellen Unterschiede des e.F. nicht beseitigen lassen. Der zwischen 1. und 2. Messung bestehende Unterschied von 9,26 ml/kg liegt nach dem Ergebnis der statistischen Auswertung im Zufallsbereich.

Tabelle 1a. *Varianzschema zu Tab. 1. Spezifisches extracelluläres Flüssigkeitsvolumen (ml/kg) in Abhängigkeit von Vpn. und Messung.*

Bestandteil der Streuung	S. d. A. Q.	f	s^2	s^2_x/s^2_R	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$	$F_{0,001}$
Versuchspersonen . . .	24036,16	9	2670,7	8,78**	3,18	5,35	10,10
1./2. Messung . . .	432,16	1	432,16	1,422	5,12	10,56	22,86
Rest	2737,84	9	304,2				
Gesamt	17206,16	19	1432,0	$s_R = 17,44$ ml/kg			

S. d. a. Q. = Summe der Abweichungsquadrate. — f = Freiheitsgrad. — s^2 = Streuungsquadrat. — s^2_x/s^2_R = untersuchtes Streuungsquadrat/Reststreuungsquadrat. — s_R = Reststreuung. — $F_{0,05}$ = Signifikanzmaß für 5 %-Grenze. — $F_{0,01}$ = Signifikanzmaß für 1 %-Grenze. — $F_{0,001}$ = Signifikanzmaß für 0,1 %-Grenze. — * = signifikant für 5 %-Grenze. — ** = signifikant für 1 %-Grenze. — *** = signifikant für 0,1 %-Grenze.

Die Reststreuung (s_R) beträgt $\pm 17,44$ ml/kg. Sie ist im wesentlichen auf den methodischen Fehler zu beziehen.

Die Tab. 2 zeigt die entsprechenden Meßwerte vor und nach Digitoxinbehandlung. Einem Mittelwert von 178,5 ml/kg vor Digitoxin steht ein solcher von 185,8 ml nach Digitoxin gegenüber. Das zugehörige Varianzschema (Tab. 2a) zeigt, daß dieser geringe Unterschied, wie zu erwarten war, nicht signifikant ist. Die Unterschiede der Vpn. sind hier nicht so ausgesprochen wie bei der Kontrollgruppe. Die Reststreuung liegt mit $s_R = \pm 16,53$ ml/kg in derselben Größenordnung wie die der Kontrollgruppe.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Für die Ermittlung der Normalwerte lassen sich die 20 Bestimmungen der Kontrollgruppe und die 9 ersten Bestimmungen der Digitoxingruppe verwerten. Berechnet man aus diesen Daten den Mittelwert, so findet man 182,5 ml/kg bzw. 18,25% des Körpergewichtes. Die so ermittelten

Tabelle 2. *Spezifisches extracelluläres Flüssigkeitsvolumen (ml/kg) in Abhängigkeit von Versuchspersonen und Digitoxin.*

Nr.	Name	Alter	vor Digitoxin	nach Digitoxin
11	H. G.	26	140,0	194,5
12	G. S.	28	190,5	172,8
13	L. S.	35	175	186,0
14	M. B.	39	171	164
15	A. B.	53	179,5	181,0
16	H. R.	28	202,0	222,0
17	K. S.	23	164,5	145,7
18	A. H.	18	217,0	215,5
19	E. H.	32	166,8	191
Mittelwert			178,5	185,8

Tabelle 2a. *Varianzschema zu Tab. 2.*

Bestandteil der Streuung	S. d. A. Q.	f	s^2	s^2_x/s^2_R	$F_{0,05}$	$F_{0,01}$	$F_{0,001}$
Versuchs- personen . . .	6478,37	8	809,79	3,0	3,44	6,03	12,04
Digitoxin . . .	238,37	1	238,37	0,884	5,32	11,26	25,42
Rest	2158,63	8	269,83				
Gesamt	8875,37	17	522,0	$s_R = \pm 16,53 \text{ ml/kg}$			

Normalwerte stehen in guter Übereinstimmung mit den von den amerikanischen Autoren angegebenen, die im Mittel 16,2% des Körpergewichtes fanden. Es ist zu überlegen, ob die geringfügig höheren Werte in den hier vorgelegten Versuchen auf das unterschiedliche Geschlecht der Vpn. bezogen werden können. Wurden doch die eigenen Untersuchungen im Gegensatz zu denen von SCHWARTZ, SCHACHTER und FREINKEL ausschließlich an weiblichen Vpn. durchgeführt. Entsprechende Vergleichsuntersuchungen liegen noch nicht vor. Die bei einigen Vpn. beobachteten großen Schwankungen zwischen 1. und 2. Bestimmung können nicht auf methodische Fehler — Verlust beim Sammeln des inulinhaltigen Urins, Totraumfehler, Fehler der chemischen Bestimmung — zurückgeführt werden, sondern sind wohl auf reelle Schwankungen des e.F. zu beziehen.

Der Vergleich des e.F. bei derselben Vp. vor und nach Digitoxingaben brachte keine signifikante Änderung. Die bisher beschriebenen Vergrößerungen des Extracellularraumes (HANDLEY und TELFORD, CHAPMAN und HANDLEY) wurden am Tier mit Digitalisdosen erzielt, welche weit über den am Menschen gebräuchlichen therapeutischen liegen.

Zusammenfassung.

An 9 gesunden Versuchspersonen wurde mit Hilfe der Inulinmethodik das extracelluläre Flüssigkeitsvolumen vor und nach 2,2 mg Digitoxin bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten 10 normale Versuchspersonen, bei denen im Abstand von 4 Tagen eine zweite Bestimmung ohne vorherige Gabe von Digitalis durchgeführt wurde. Es fanden sich folgende Ergebnisse:

1. Der aus 29 Einzelbestimmungen gewonnene Mittelwert des spezifischen extracellulären Flüssigkeitsvolumens betrug 182,5 ml/kg, also 18,2% des Körpergewichtes.

2. Nach Digitoxin in der angegebenen Dosierung fand sich keine signifikante Veränderung des extracellulären Flüssigkeitsvolumens.

Literatur.

CALCAGNO, P. L., G. S. HUSSON and M. I. RUBIN: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **77**, 309 (1951). — CHAPMAN, D. W., and C. A. HANDLEY: *J. Clin. Invest.* **28**, 774 (1949). — DEANE, N., G. E. SCHREINER and J. S. ROBERTSON: *J. Clin. Invest.* **30**, 1463 (1951). — DEANE, N., M. ZIFF and H. W. SMITH: *J. Clin. Invest.* **31**, 200 (1952). — DEANE, N., and H. W. SMITH: *J. Clin. Invest.* **31**, 197 (1952). — DEUTSCH, E.: *Klin. Med.* **1952**, 385. — DOERING, P., H. SCHROETER, W. SCHUBERT u. M. SCHWAB: *Klin. Wschr.* **1953**, 301. — GAUDINO, M., and M. F. LEVITT: *Amer. J. Physiol.* **157**, 387 (1949). — HANDLEY, C. A., and I. TELFORD: *J. of Pharmacol.* **89**, 97 (1947). — HOFFMAN, G., u. E. WITTE: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **211**, 221 (1950). — HUBBARD, R. S., and T. A. LOOMIS: *J. of Biol. Chem.* **145**, 641 (1942). — LEVITT, M. F., and M. GAUDINO: *Amer. J. Med.* **9**, 208—215 (1950). — OVERMAN, R. R.: *J. Labor. a. Clin. Med.* **31**, 1170 (1946). — OVERMAN, R. R., and H. A. FELDMAN: *J. Clin. Invest.* **27**, 1049 (1947). — SCHWARTZ, I. L., E. S. BREED and M. H. MAXWELL: *J. Clin. Invest.* **29**, 517 (1950). — SCHWARTZ, I. L., D. SCHACHTER and N. FREINKEL: *J. Clin. Invest.* **28**, 1117 (1949). — WALSER, M., D. N. SELDIN and A. GROLLMAN: *J. Clin. Invest.* **31**, 669 (1953); **32**, 299 (1953).

Doz. Dr. M. SCHWAB, Med. Univ.-Klinik Göttingen.

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften und dem Pharmakologischen Institut der Humboldt-Universität zu Berlin.

Zur Häm-Häm-Wechselwirkung beim roten Blutfarbstoff.

Von

WERNER SCHELER und FRITZ JUNG.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Juni 1953.)

ROUGHTON hatte festgestellt, daß partiell zu Methämoglobin oxydiertes Hämoglobin ähnlich wie partiell CO-gesättigtes Hämoglobin einen gegen $n = 1$ gehenden Sigmakoeffizienten besitzt: Die Sauerstoffbindungskurve des restlichen Hämoglobins geht gegen eine echte Hyperbel. GIBSON und KIESE bestätigten später diesen Befund und wiesen auf seine Bedeutung für den Verlauf einer Vergiftung mit einem Methämoglobinbildner hin: Ähnlich wie bei einer CO-Vergiftung werde auch bei Methämoglobinbildung das Hämoglobin zu einem weit größeren Teil funktionsuntauglich, als aus dem blockierten Anteil zu errechnen ist. — Da CO im Blut frei diffusibel ist, die Oxydationsäquivalente des Methämoglobins dagegen nicht, ist dieser Schluß nur bedingt richtig. Schon früher war von uns darauf hingewiesen worden, daß bei Vergiftungen das veränderte Hämoglobin nicht gleichmäßig über die Blutzellen verteilt ist. Partiiell methämoglobinhaltiges Blut könnte somit auch ausschließlich aus 100% methämoglobinführenden und aus normalen Zellen bestehen. Es sollte dann eine normale Sauerstoffbindungskurve besitzen. Im allgemeinen aber wird ein Zwischenzustand bestehen, bei dem n erniedrigt ist, jedoch nicht bis auf den aus den ROUGHTONschen Versuchen errechenbaren Wert. Es war somit zu belegen, daß methämoglobinhaltiges Blut bei gleichem Methämoglobingehalt sehr verschiedene Werte von n besitzen kann.

Ferner hatte ROUGHTON seinerzeit vergeblich versucht, die beim Mischen von Hämoglobin und Methämoglobin eintretende intermolekulare Umsetzung zu fassen. Eine annähernde Angabe der Geschwindigkeit dieser Umsetzung ist uns möglich. Sie dürfte für den Mechanismus der Methämoglobininrückbildung nicht bedeutungslos sein.

Methodik.

Hämoglobin und Methämoglobin wurden colorimetrisch mittels der Cyanidmethode (HAVEMANN, JUNG und v. ISSEKUTZ) bestimmt. Als Meßinstrument diente ein mit Interferenzfiltern ausgestattetes lichtelektrisches Colorimeter. Die Lichtquelle war eine Autoscheinwerferlampe, deren Heizspannung stabilisiert wurde. pH-Kontrollen erfolgten mittels der SCHOTTschen Glaselektrode und einem direkt

anzeigenden Röhrenvoltmeter (RFT). Die Gasanalysen wurden mittels einer VAN SLIKE- und einer HALDANE-Apparatur durchgeführt.

Für die Mischversuche wurde ein besonderes zweikammeriges Tonometer gebaut. In diesem wurden Hämoglobin und Methämoglobin bzw. die beiden Blutzellsuspensionen mit dem Gas durch schnelles Rotieren bei Zimmertemperatur äquilibriert (Abb. 1).

Methämoglobin wurde meist intracellulär durch Nitrit und anschließendes Auswaschen des Nitrits gebildet. Zur Entfernung der Stromata wurde hochtourig (18000 U/min) zentrifugiert. Ein Teil der Versuche wurde mit frischem nativem Hämoglobin, ein weiterer Teil mit kristallisiertem Pferdehämoglobin durchgeführt.

Die Sauerstoffbindungskurven wurden jeweils auf einem Spezialpapier aufgetragen, dessen Abszisse logarithmisch und dessen Ordinate nach $\log y/100-y$ (bzw. nach $\log \text{HbO}_2/(\text{Hb}-\text{HbO}_2)$) geteilt war. Angegeben wurden auf den Abbildungen

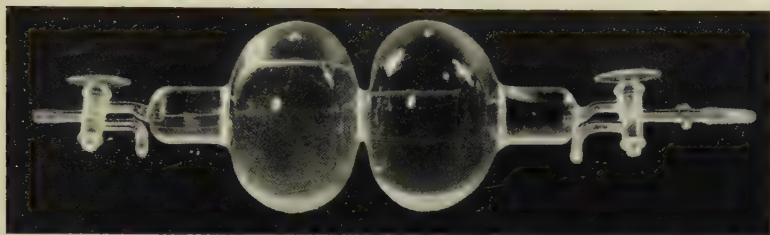


Abb. 1. Zweikammeriges Tonometer zur Äquilibrierung zweier Lösungen mit einer gemeinsamen Gasphase.

an der Abszisse der Logarithmus des O_2 -Druckes, an der Ordinate dagegen der Prozentwert an HbO_2 direkt. Die Darstellung in einem solchen Netz führt zu einer Auflösung der HILLSchen Gleichung für die O_2 -Bindung des Hämoglobins, die in dem von uns geprüften Bereich als streng gültig angesehen werden darf: Die logarithmische Teilung der Abszisse macht die unsymmetrische O_2 -Bindungskurve symmetrisch, und die Ordinatenteilung führt die um den 50%-Wert symmetrische S-Kurve des semilogarithmischen Netzes in eine Gerade über. Deren Schnittpunkt mit der 50%-Linie liefert die Gleichgewichtskonstante K , ihre Steigung dagegen den Exponenten der HILLSchen Gleichung, nämlich den uns interessierenden Sigma-koeffizienten n . Dieses graphische Analysenverfahren wird in der Literatur wiederholt angewandt, zuletzt etwa bei A. F. RIGGS (1951).

I. Die Sauerstoffbindung in methämoglobinhaltigem Blut und Hämolysaten.

A. Zellsuspensionen wurden durch vorsichtige Zugabe von NaNO_2 unter gleichzeitigem Rühren auf etwa 75% Methämoglobin gebracht. Das Nitrat wurde — um Weiterreaktion zu vermeiden — anschließend ausgewaschen. Die Zellproben zeigten den von ROUGHTON beschriebenen Effekt: Die Sauerstoffbindungskurve besaß einen Sigma-koeffizienten von $n = 1,3-1,4$.

B. Es wurden nun methämoglobinfreie Blutzellsuspensionen ($n = 2,8$) mit Suspensionen von nur Methämoglobin besitzenden Zellen gemischt. Die Endkonzentration an Methämoglobin in der entstandenen Zellsuspension betrug wiederum 75%. Trotzdem ergab sich wieder ein $n = 2,5$,

wie es auch zu erwarten war. — Abb. 2 zeigt das verschiedene Verhalten der beiden Zellsuspensionen.

C. Die nach B hergestellten Zellsuspensionen wurden durch wiederholtes Gefrieren hämolysiert. Das Hämolysat zeigte bereits nach 20 min ein $n = 1$. Es muß also ziemlich schnell eine Umsetzung stattgefunden haben, die zu „partiell oxydierten Molekülen“ führte.

D. Während in den nach B hergestellten Zellgemischen auch bei längerer Aufbewahrung keine wesentliche Änderung von n eintritt, konnte eine solche erreicht werden, wenn dem Gemisch Methylenblau zugegeben wurde. Es ergab sich dann nach 2 Std ein $n = 1,2$.

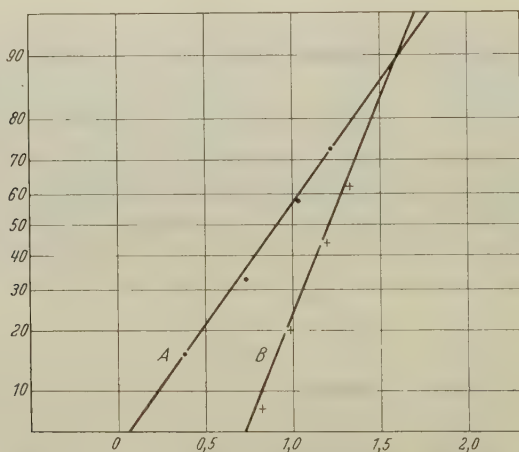


Abb. 2. Sauerstoffbindungskurven von Erythrocytensuspensionen mit etwa 75% Methämoglobin. Kurve A: Verteilung des Methämoglobins über alle Blutzellen. Kurve B: 25% normale Blutzellen neben 75% Zellen, deren Hämoglobin vollständig oxydiert ist. Ordinate: Prozent Oxyhämoglobin des gesamten funktionsfähigen Hämoglobins. Abszisse: Sauerstoffdruck in Millimeter (logarithmisch aufgetragen). Von Bedeutung ist jeweils die Steigung, nicht der Schnittpunkt mit 50% Linie; der letztere variiert mit dem wechselnden p_H des Ansatzes, während die Steigung (d. h. das gesuchte n) von p_H und CO_2 -Konzentration nicht beeinflußt wird.

II. Die Geschwindigkeit der „intermolekularen Umsetzung“.

Die beiden Hämolysate der normalen und der methämoglobinführenden Zellen wurden in den 2 Kammern des Tonometers ins Gasgleichgewicht gebracht. Dann wurden sie zusammengegeben und kräftig weiter rotiert. In kurzen Zeitabständen wurden Proben entnommen und analysiert. Die auf diese Weise erhaltenen Meßergebnisse sind in Abb. 3 wiedergegeben. Dieses Ergebnis kann aber nicht direkt ausgewertet werden, da in ihm noch die Gasausgleichsgeschwindigkeiten innerhalb der Versuchsanordnung enthalten sind. Aus diesem Grunde wurde eine bestimmte Menge wäßrige Phase in dasselbe Tonometer gebracht, O_2 eingegeben und kurz rotiert. Wieder wurden in verschiedenen Zeitabständen

Proben entnommen und analysiert. Es ergab sich, daß etwa 50% Gas-
ausgleich nach 60 sec eingetreten war, weitere Werte vgl. Abb. 4. Da im
Versuch selbst ein Absinken von n um 50% seines Gesamtabfalles (d. h.

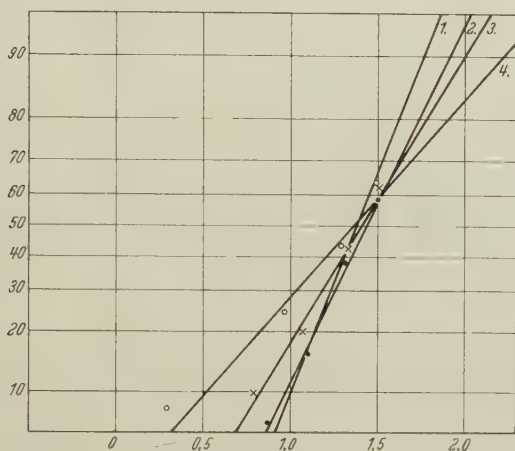


Abb. 3. Sauerstoffbindungskurven von Gemischen mit 25% einer Hämoglobinlösung und 75% einer Methämoglobinlösung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Mischen. Versuch im gemeinsamen Gasraum. Kurve 1 vor dem Mischen (Ausgangskurve), Kurve 2 etwa 60 sec danach (Meßpunkte •), Kurve 3 etwa 100 sec danach (Meßpunkte ×) und Kurve 4 260 sec danach (Meßpunkte ○). Abszisse und Ordinate wie Abb. 2.

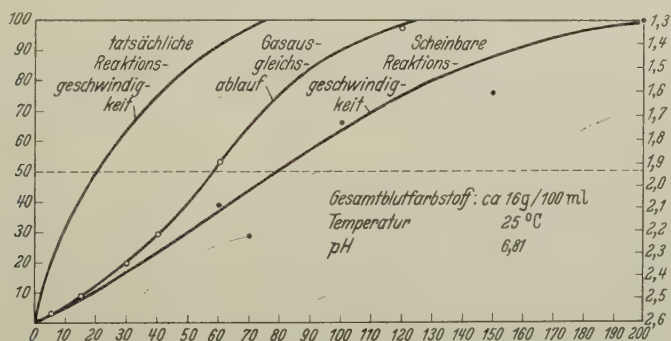


Abb. 4. Siehe Text. Ordinate: n , d. h. Sigmoidkoeffizient der O_2 -Bindungskurve. Abszisse: Zeit nach der Mischung in Sekunden. • Meßpunkte der eigentlichen Umsetzung. o Meßpunkte der Gasausgleichskurve.

auf etwa 1,9 bei Ausgangswert 2,6 und Endwert 1,3) innerhalb 80 sec beobachtet wurde, kann nur die Differenz von 20 sec ein Maß für die Geschwindigkeit der von uns gesuchten Reaktion sein. Solche Differenzen wurden als „tatsächliche Reaktionszeiten“ in Abb. 4 gegenüber den verschiedenen Werten von n aufgetragen, wodurch die Kurve der „tatsächlichen Reaktionsgeschwindigkeit“ erhalten wurde. Dieses Verfahren

ist weder exakt noch korrekt; es liefert aber angenäherte Werte, wobei man annehmen darf, daß die Fehler der Berechnung nicht größer sind als die aus Abb. 4 zu entnehmenden erheblichen Fehler der Analyse selbst. — Das Endergebnis ist daher nur annähernd richtig: Die Umsetzung besitzt eine Halbwertszeit von etwa 20 sec und ist in etwa 70 sec im wesentlichen abgelaufen ($p_H = 6,8$, Temperatur = 25° und Hb-Konzentration = etwa 16 g/100 ml) (vgl. Abb. 4).

III. Die Natur der intermolekularen Umsetzung.

1. In einem weiteren Versuch wurde die Umsetzung in Gegenwart von HCN durchgeführt, wobei also Hb(3)-CN mit Hämoglobin gemischt wird und nicht Hb(3). Es ergab sich keine Veränderung gegenüber dem Versuch mit Hb(3), da sich n ebenfalls gegen 1 verschob (1,2 und 1,5 in 2 Versuchen).

2. Es wurde nach dem von KIESE¹ angegebenen Verfahren Verdoglobin-NO₂ dargestellt und mit Hämoglobin gemischt. Eine Verschiebung der Sigmakonstanten wurde dabei nicht festgestellt (n blieb 3).

3. Im Zusammenhang mit einer andersartigen Versuchsreihe wurden nunmehr Hämoglobin und Methämoglobin in einem besonderen Reaktionsgefäß getrennt mit CO ins Gleichgewicht gebracht und dann beide Lösungen zusammengegeben. Der Versuch fand unter CO statt, so daß Änderungen der Sigmakonstanten sich nicht äußern durften. Der Druck im Gasraum begann unmittelbar nach dem Mischen der Lösungen abzusinken, ein Befund, der nur mit CO-Bindung, d. h. Reduktion des Methämoglobins erklärlich war. Der Versuch verläuft am besten mit nativem (und dialysiertem) Hämoglobin, konnte jedoch auch an kristallisiertem Hämoglobin durchgeführt werden.

Besprechung.

A. Mit den in Abschnitt I berichteten Versuchen dürfte belegt sein, daß partiell methämoglobinhaltiges Blut je nach der Verteilung des Methämoglobins auf die Zellen verschiedene physiologische Eigenschaften besitzt. Unter ungünstigsten Bedingungen kann daher ein Methämoglobingehalt von 60—70% letal sein, er braucht es jedoch nicht. Dies entspricht auch Erfahrungen im Tierversuch, in dem mitunter Werte über 70% längere Zeit ertragen werden, obwohl hierbei eine praktisch vollständige Transportunfähigkeit des Hämoglobins vorliegen müßte.

B. Die Geschwindigkeit der intermolekularen Umsetzung war insofern von Interesse, als die bekannten Daten über die Struktur des roten Blutkörperchens nicht erwarten lassen, daß das Hämoglobin innerhalb der Zelle diffusibel ist. Nimmt man an, daß die Fermentsysteme irgendwo an der Struktur lokalisiert sind, so müssen bei der Methämoglobinrück-

bildung die zur Verfügung gestellten Reduktionsäquivalente irgendwie an die Hämoglobinmoleküle herangebracht werden. Dies kann durch einen leicht diffusiblen Stoff oder durch Energieleitung geschehen. Der in den Hämolysaten erfaßte Prozeß könnte ein Modell dieser Energieleitung sein.

C. Von besonderem Interesse ist die Natur der Umsetzung. Da das System Hämoglobin-Methämoglobin in Gegenwart von Sauerstoff nicht im thermodynamischen Gleichgewicht ist, ist eine einfache Redoxreaktion $\text{Hb}(3)_4 \longleftrightarrow \text{Hb}(2)_4$ zum Endprodukt $\text{Hb}(2)_3\text{Hb}(3)$ nicht denkbar. Damit entfällt übrigens auch die Vorstellung eines einfachen Energieleitungsprozesses über die Fe der Häme hinweg (HAVEMANN, mündliche Mitteilung). Am einfachsten wäre der Vorgang als Folge einer Dissoziation und Rekombination des Hämoglobins verständlich. Diese von HAVEMANN vorgeschlagene Deutung ist plausibel; ein gewisses Gegenargument ist die Tatsache, daß Verdoglobin- NO_2 nicht die Fähigkeit zur Veränderung von n besaß. Da im Verdoglobin- NO_2 noch die ursprüngliche Struktur des Eiweißanteils vorliegen soll (?), müßte es zu einer solchen Rekombinationsreaktion fähig sein. Ferner erklärt die HAVEMANNsche Deutung auch den Effekt des Methylenblaus nicht (Abschnitt I D), der eindeutig auf die Beteiligung von Reduktionsvorgängen hinweist.

Nachdem A. F. RIGGS überzeugende Befunde für den Zusammenhang zwischen n und den SH-Gruppen am Globin vorgelegt hat, ziehen wir zunächst eine andere Deutung unserer Ergebnisse vor. Wir nehmen an, daß unter bestimmten Bedingungen das SH des Globins durch das dreiwertige Eisen des Methämoglobins oxydiert werden kann. Hinweise in dieser Richtung sind die Befunde SCHÜLERS, die wir durch eigene Studien ergänzt haben (JUNG). Ein direkter Beleg in dieser Richtung ist der unter III 3 beschriebene Versuch, bei dem auf das völlige Fehlen von Stoffwechselsubstraten wie Fermenten ausdrücklich hingewiesen werden muß. Hier äußert sich der von uns postulierte Vorgang in der Reduktion eines kleinen (!) Teils des Methämoglobins. Berücksichtigt man nun, daß in den Versuchen ROUGHTONS und seiner Nachahmer das Methämoglobin in großem Überschuß gegenüber dem Hämoglobin vorlag, so dürfte auch dort das SH des nativen Hämoglobins oxydiert worden sein. Dies wäre eine einfache Erklärung der Verkleinerung von n , die ja nach RIGGS eine Folge der SH-Oxydation oder -Blockierung ist. Für entschieden halten wir die Frage allerdings noch nicht, da man einerseits über das Zusammenspiel von SH bzw. reduzierenden Gruppen am Protein mit dem Fe noch nicht genügend weiß (vgl. auch LEMBERG u. LEGGE sowie GEORGE), und andererseits die Daten über die Sauerstoffbindung partiell oxydierten Hämoglobins präziser erscheinen als bei der Beteiligung eines so labilen Systems wie des Globin-SH wahrscheinlich wäre. Sollte aber diese Hypothese richtig sein, so würden bei der „intermolekularen Umsetzung“

keine Mischmoleküle entstehen, sondern nur ein kleiner Teil des Methämoglobins reduziert werden. Dies würde auch zu der von BOERI u. VESCIA vertretenen Ansicht passen, nach der stets nur vollständig reduzierte und oxydierte Moleküle vorhanden sind.

Anhang.

In den oben mitgeteilten Versuchen wurde es notwendig, durch eine Schar von Punkten eine Ausgleichsgerade zu legen, deren Steigung das gesuchte Ergebnis darstellte. Die statistische Lehrbuchliteratur stellt dafür einfache Verfahren zur Verfügung, deren Grundlage das GAUSSSCHE Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate ist. Setzt man also für die gesuchte Gerade die Formel $y = a + bx$, so wird für die einzelnen empirischen Punkte (x_i, y_i) entweder die Differenz $(x - x_i)$ oder $(y - y_i)$ gebildet und durch geeignete Wahl von a und b die $\sum(x - x_i)^2$ bzw. $\sum(y - y_i)^2$ zu einem Minimum gemacht. Es fiel uns auf, daß die auf diese Weise erhaltenen Ausgleichsgeraden mitunter nicht den „Erwartungen“ entsprechen. Tatsächlich sind diese Formeln nur richtig, wenn bei den Messungen entweder die y -Werte (Wahl der Differenz $[x - x_i]$) oder die x -Werte (Wahl der Differenz $[y - y_i]$) unabhängige Veränderliche darstellen. Dies heißt für das Experiment, daß sie durch den Untersucher gewählt und infolgedessen fehlerfrei sind. Sind aber sowohl die einzelnen x_i wie y_i das Ergebnis von fehlerbehafteten Analysen (in unserem Beispiel Bestimmung des O_2 -Druckes bzw. Gehaltes in der Gasphase einerseits und Bestimmung des Verhältnisses O_2Hb/Hb in der Blutprobe andererseits), so ist das nicht statthaft, sondern man wird diejenige Gerade suchen müssen, bei welcher der Abstand der Punkte von der Geraden das kleinste Fehlerquadrat zeigt. Die Rechnung wird dadurch erheblich erschwert, das Ergebnis dafür aber richtig. Der Abstand eines Punktes (x_i, y_i) von der Geraden $y = a + bx$ beträgt bekanntlich

$$D = \frac{bx_i - y_i + a}{\sqrt{1 + b^2}}$$

Es muß also für K Punkte das Minimum für $\sum D^2$ gesucht werden. Hierzu werden die partiellen Differentialquotienten $\frac{\partial \sum D^2}{\partial a}$ und $\frac{\partial \sum D^2}{\partial b}$ gebildet und gleich 0 gesetzt. Nach einer längeren Rechnung folgt schließlich für b eine quadratische Gleichung, aus welcher sich

$$b = \frac{(\sum x_i^2 - \sum y_i^2) - \frac{1}{K}(\sum^2 x_i - \sum^2 y_i)}{2(\sum x_i y_i - \frac{1}{K} \sum x_i \sum y_i)} \pm \sqrt{\frac{[(\sum x_i^2 - \sum y_i^2) - \frac{1}{K}(\sum^2 x_i - \sum^2 y_i)]^2}{4(\sum x_i y_i - \frac{1}{K} \sum x_i \sum y_i)} + 1}$$

ergibt. a läßt sich dann in ähnlicher Weise aus

$$a = \frac{\sum y_i}{K} - \frac{b \sum x_i}{K}$$

errechnen, einer Formel, die aus dem ersten der oben angeführten Differentialquotienten erhalten wird. — Daß zwei sich im Schwerpunkt des Punktesystems schneidende Gerade erhalten werden, ist verständlich.

Die Ausgleichskurven in der vorhergehenden Arbeit wurden nach diesem Verfahren berechnet, nachdem ein Versuch, die üblichen Regressionskoeffizienten bzw. Trendformeln zu gebrauchen, an den offenkundig unrichtigen Ergebnissen scheiterte. — Bedauerlicherweise werden die Formeln für die Streuung von b unhandlich. Man wird aber hier ohne weiteres als Annäherung die Streuung — falls man sie nicht zahlenmäßig aufaddieren will — des üblichen Regressionskoeffizienten einsetzen dürfen. Die entstehenden Fehler dürften kaum erheblich sein.

Zusammenfassung.

1. Die O_2 -Bindungskurve partiell methämoglobinhaltigen Blutes ist je nach der Verteilung des Methämoglobins auf die Zellen verschieden. Sie kann unter extremen Bedingungen normal sein oder die von ROUGH-TON angegebene Veränderung des Sigmakoeffizienten zeigen. Im allgemeinen dürften jedoch weniger reduziert sein, als der ROUGHTONSchen Theorie entspricht.

2. Die Umsetzung zwischen Hämoglobin und Methämoglobin unter Veränderung der O_2 -Bindungskurve verläuft sehr rasch. Ihre Geschwindigkeit wurde annähernd bestimmt.

3. Diese Umsetzung braucht keine einfache Redoxreaktion unter Bildung partiell oxydierter Hämoglobinmoleküle zu sein, sondern kann auch eine Veränderung des Eiweißes des zugesetzten Hämoglobins durch das Methämoglobin (etwa Oxydation des SH) zur Ursache haben.

Literatur.

BOERI, E., u. A. VESCIA: *Experimentia* **3**, 155 (1947). — DARLING, R. C., u. F. I. W. ROUGHTON: *Amer. J. Physiol.* **137**, 56 (1942). — GEORGE, PH.: *Adv. in Catalysis* **4**, 367 (1952). — GIBSON, Q. H., u. D. C. HARRISON: *Lancet* **1947**, 941. — HAVEMANN, JUNG u. V. ISSEKUTZ: *Biochem. Z.* **301**, 116 (1939). — JUNG, F.: *Dtsch. Gesundheitswesen* **7**, 1313 (1952) und unveröffentlicht. — KIESE, M.: (1.) *Naturwiss.* **33**, 123 (1946). — (2.) *Dtsch. Arch. klin. Med.* **195**, 442 (1949). — KIESE, M., u. G. KLINGMÜLLER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **207**, 655 (1949). — KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **204**, 385 (1947). — LEMBERG u. LEGGE: *Haematin Compounds and Bile Pigments*. Interscience, New York 1949. — RIGGS, A. F.: (1.) *J. Gen. Physiol.* **35**, 41 (1951); (2.) **36**, 1 (1952). — SCHÜLER, H.: *Biochem. Z.* **255**, 474 (1933).

Prof. Dr. F. JUNG, Berlin-Buch, Lindenberger Weg 78.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G. Berlin-West.

Die Verteilung von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und Sulfacarbamid auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.

Ein Beitrag zur Dynamik von Verteilungsvorgängen.

II. Mitteilung*.

Von

H. LANGECKER und E. SCHULZE.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. September 1953.)

Untersuchungen über die Verteilung von Sulfonamiden beim nierenlosen Hund hatten zu der Annahme geführt, daß im Anschluß an eine intravenöse Injektion nach beendeter Durchmischung in den Körpersäften das Eindringen in gut durchblutete Gewebe und leicht zugängliche Räume etwa nach 20 min beendet ist und daß daran anschließend weiterhin ein Eindringen in schlecht durchblutete Gewebe und schwer zugängliche Räume erfolgt. Um die Dynamik der Verteilung in verschiedenen Räumen zu erkennen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben der Verteilung auf die Blutphasen in vitro parallel mit Konzentrationsabläufen im Blut auch solche in Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund unter Benutzung nicht reaktiver Modellsubstanzen aus der Sulfonamidreihe: Sulfanilsäure, Sulfacarbamid, Sulfanilamid verfolgt.

Methode. Bezüglich der Sulfonamidbestimmung und der Verteilungsversuche am nierenlosen Hund nach intravenöser Verabreichung von 80 mg/kg Sulfonamid vgl. Mitteilung I. Für die Verteilung auf die Blutphasen wurde Hunde-Citratblut durch entsprechende Zusätze von Sulfonamiden auf eine Endkonzentration von 10, 20, 40 und 80 mg% gebracht und durch Zentrifugieren und Ultrafiltrieren in Erythrocyten, Plasma und Blutwasser aufgeteilt. Die Adsorption der verwendeten Filter (Ultracellafeinstfilter, Membranges. Göttingen, Porengröße 5—10 m μ , auf Eiweißdichtigkeit geprüft) wurde durch Ultrafiltration wäßriger Lösungen geeigneter Konzentrationen festgestellt. Die ermittelten Plasma-Ultrafiltratwerte wurden entsprechend korrigiert. Die Zellplasmarelation wurde mittels Haematocrit bestimmt. Die Berechnung der prozentuellen Anteile erfolgte nach WITZGALL. Der

* I. Mitteilung siehe 218, 278 (1953).

** Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden von dem einen von uns als Dissertation an der tierärztl. Fakult. der F U Berlin verwertet.

Liquor wurde durch Zisternalpunktion in Mengen von 0,5—1 ml aspiriert. Das Kammerwasser wurde durch Punktion der Vorderkammer am Limbus erhalten. Für die Gewinnung von Pericardflüssigkeit wurden aus dem rasch nach dem Tod eröffneten Herzbeutel mit einer stumpfen Kanüle 0,2—2,5 ml Flüssigkeit abgesaugt.

In der Tab. 1 sind die aus 5 gut übereinstimmenden Versuchen mit 4 verschiedenen Sulfonamidkonzentrationen errechneten Verteilungsverhältnisse im Blut dargestellt. Sulfanilamid verteilt sich gleichmäßig zwischen Erythrocyten- und Plasmaphase, während die mäßig ionisierten Verbindungen Sulfanilsäure und Sulfacarbamid zum größten Teil in der Wasserphase vorkommen.

Tabelle 1. Verteilung von Sulfanilamid, Sulfanilsäure und Sulfacarbamid auf die Phasen des Hundeblutes *in vitro*.

	mg % Blut	% der Gesamtmenge			
		Erythro- cyten- Wasser	Erythro- cyten- Eiweiß	Plasma- Eiweiß	Plasma- Wasser
Sulfanilamid	10,1	10,5	38,9	21,3	28,9
	20,0	12,7	31,8	20,6	34,9
	38,9	13,1	31,1	19,75	35,9
	79,7	12,6	31,1	21,4	34,8
Sulfanilsäure	10,6	18,9	9,3	19,5	52,1
	20,5	21,1	5,4	15,5	58,0
	39,7	22,2	6,6	10,4	62,4
	81,3	23,1	5,6	8,2	63,6
Sulfacarbamid	10,3	22,3	12,6	3,8	61,4
	19,9	22,5	11,6	4,2	61,7
	39,9	22,4	11,5	4,6	61,5
	83,3	21,4	13,1	5,6	59,8

Die Dynamik der Verteilung *in vivo* entspricht bei Sulfanilsäure und Sulfanilamid den in der ersten Mitteilung gewonnenen Erfahrungen (Tab. 2). Sulfacarbamid erreicht nach 50 min ein Verteilungsvolumen von 30,4—37,7% ($m = 34,5 \pm 1,03$). Sulfacarbamid unterliegt nach unseren Versuchen auch beim Hund kaum einer Carbonsäureamidspaltung und ist, da auch sonst beim Hund keine Veränderungen im Stoffwechsel stattfinden, als nicht reaktive Substanz anzusehen (LANG-ECKER²).

Man konnte daher für diese wenig ionisierte Verbindung, die nur geringe Affinität zu Eiweiß hat, von vornherein eine gute Übereinstimmung zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Verteilung erwarten, und das Verteilungsvolumen ist offenbar infolge einer größeren Affinität zum Erythrocyteneiweiß etwas größer als bei Sulfanilsäure, aber bedeutend kleiner als beim Sulfanilamid.

Um die Dynamik der Verteilung in den verschiedenen Räumen zu veranschaulichen, wurden in Abb. 1 für Sulfanilamid die Konzentrations-

abläufe in Blut, Ultrafiltrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit unter Bezugnahme auf die zum Zeitpunkt des Verteilungsgleichgewichts erreichte Blutkonzentration dargestellt, die gleich 1 gesetzt wurde. Man erkennt daraus, daß die Substanz rasch in Liquor und Kammerwasser eindringt und nach 120 min Plasma-Ultrafiltratkonzentrationen erreicht. In der Pericardflüssigkeit werden zur gleichen Zeit schon höhere Konzentrationen gefunden. Sulfanilsäure hingegen erscheint in Liquor und Kammerwasser nur in geringen Konzentrationen, die nach 120 min $\frac{1}{16}$ bzw. $\frac{1}{8}$ der Ultrafiltratkonzentrationen betragen. In der Pericardflüssigkeit werden zu diesem Zeitpunkt $\frac{3}{4}$ der Ultrafiltratkonzentration erreicht (vgl. Tab. 2). Auch Sulfacarbamid dringt in Liquor und Kammerwasser langsam ein und erreicht in der Pericardflüssigkeit fast die Ultrafiltratkonzentration. Es wird also der Subarachnoidalraum am langsamsten und der Herzbeutel am raschesten aufgefüllt. Damit bringen die Versuche eine Unterstützung für die eingangs geäußerte Annahme, daß nach beendigter Durchmischung der Körpersäfte das Eindringen in leicht zugängliche Räume und gut durchblutete Gewebe in den ersten 20 min über kurze Diffusionswege und nahezu zeitlose Adsorptionsvorgänge beendet ist, während im weiteren Verlauf das Eindringen bevorzugt in schwer zugängliche Räume und schlecht durchblutete Gewebe erfolgt.

Subarachnoidalraum und Vorderkammer können als schwer zugänglich betrachtet werden, der Herzbeutel hingegen als leicht. Das Eindringen aus der Blutwasserphase in Liquor und Kammerwasser — zell- und eiweißarme Flüssigkeiten — erfolgt auf alle Fälle langsamer als in die leicht zugänglichen Interzellular- und Zellräume, teils wegen der längeren Diffusionswege, teils wahrscheinlich auch wegen eines Membranwiderstandes. Einen solchen muß man wohl besonders für mäßig dissoziierte Anionen annehmen, da auch die Lage des Endgleichgewichtes bei diesen Verbindungen sehr zu Ungunsten von Subarachnoidalraum und Vorderkammer liegt. Diese Schlußfolgerung steht in Übereinstimmung mit der Ansicht der meisten Untersucher, die der Schrankenmembran einen großen Einfluß zuschreiben, während WITZGALL besonders auf die Bedeutung der Molekülgröße und der adsorptiven Eiweißbindung für den Übertritt in den Liquor hinweist. Es würde demnach das Sperrgitter der Membran gegenüber bestimmten Anionen sich bevorzugt auswirken. Bei dem nahezu undissoziierten Sulfanilamid, das dasselbe Molekulargewicht wie Sulfanilsäure hat, werden auch in Liquor und Kammerwasser Blutwasserkonzentrationen erreicht, d. h. die Capillarendothelien verhalten sich in den untersuchten Räumen dem neutralen, nicht dissoziierten Sulfanilamid gegenüber gleichartig. Das Pericardiothel kann, wie alle transudatliefernden Endothelien, als stark durchlässig gelten — post mortale Veränderungen kann man wohl ausschließen. Es war daher zu erwarten, daß auch körperfremde Anionen in Blutwasserkonzentrationen anzutreffen sind, wie unsere Versuche gezeigt haben.

Man würde zunächst annehmen, daß sich die Capillarendothelien in ihrer Permeabilität im Organismus überall gleich verhalten. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß die normale Ionenzusammensetzung von Liquor und Kammerwasser sich von der des Plasmas unterscheidet (EICHLER). GREENBERG fand in Versuchen mit $\text{Na}^{23}\text{K}^{42}\text{Br}^{82}$ und J^{131} beim Hund eine nur sehr langsam eintretende Annäherung

Tabelle 2. Sulfanilamid-, Sulfacarbamid- und Sulfanilsäure-Konzentrationsablauf im Blut, Ultra-Filtrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund nach i. v. Verabreichung 80 mg/kg.

	min	5	20	50	120	Verteilungs- volumen % Körpergewicht
Sulfanilamid	Blut	24,8 ± 1,2 (2)	15,6 ± 0,48 (7)	14,1 ± 0,51 (7)	12,9 ± 0,52 (6)	
	Ultra-Filtrat.	15,4 ± 0,57 (2)	9,4 ± 0,38 (7)	8,8 ± 0,3 (7)	7,6 ± 0,26 (6)	
	Liquor . . .	1,4 ± 0,22 (2)	2,4 ± 0,13 (7)	4,7 ± 0,22 (7)	8,0 ± 0,13 (14)	
	Kammerwasser	3,3 ± 0,07 (2)	4,2 ± 0,47 (3)	5,8 ± 0,62 (3)	8,0 ± 0,75 (6)	
	Pericard . .	7,3 ± 2,2 (2)	7,2 . . . (1)	9,1 . . . (1)	10,0 ± 0,29 (4)	69,2 ± 3,7
Sulfanilsäure	Blut	70,6 ± 6,0 (2)	31,6 ± 1,35 (7)	27,2 ± 1,11 (7)	24,7 ± 1,07 (7)	
	Ultra-Filtrat.	72,7 ± 6,4 (7)	32,6 ± 1,76 (7)	28,2 ± 1,92 (7)	25,5 ± 1,64 (7)	
	Liquor . . .	0,25 ± 0,05 (2)	0,5 ± 0,09 (7)	0,8 ± 0,13 (7)	1,3 ± 0,14 (17)	
	Kammerwasser	0,7 ± 0,3 (2)	1,5 ± 0,56 (7)	2,6 ± 0,25 (4)	3,0 ± 0,39 (3)	29 ± 1,4
	Pericard . .	14,8 ± 0,25 (2)			16,3 ± 0,25 (6)	
Sulfacarbamid	Blut		25,4 ± 0,66 (7)	20,5 ± 0,42 (7)	16,9 ± 0,26 (7)	
	Ultra-Filtrat		26,2 ± 0,66 (7)	21,1 ± 0,46 (7)	17,3 ± 0,34 (7)	
	Liquor . . .		0,5 ± 0,005 (7)	0,8 ± 0,036 (7)	1,15 ± 0,035 (12)	34,5 ± 1,03
	Kammerwasser		1,6 ± 0,26 (5)	2,4 ± 0,1 (3)	2,6 ± 0,15 (6)	
	Pericard . .				15,6 ± 0,25 (6)	

der Liquorkonzentration an die des Plasmas. Besonders groß war der Unterschied zwischen Brom und Jod, was die Bedeutung der Molekülgröße für das Eindringen von Anionen erkennen läßt.

Unsere Versuche haben ergeben, daß der Subarachnoidalraum vom großen neutralen Molekül des Sulfanilamids rascher durchdrungen wird als vom gleichgroßen Anion der Sulfanilsäure. Das unterschiedliche Verhalten kommt auch in anderen Verteilungsvorgängen zum Ausdruck. In Tab. 3 sind die Beziehungen zwischen p_K , Verteilung auf die Blutphasen und das Verteilungsvolumen für einige Sulfonamide zusammengestellt.

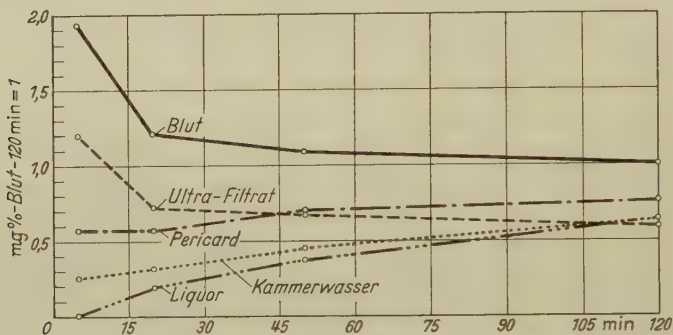


Abb. 1. Sulfanilamid-Konzentrationsablauf in Blut, Plasma-Ultra-Filtrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund nach i.v. Verabreichung von 80 mg/kg. Die Konzentrationen wurden im Verhältnis zur nach 120 min erreichten Blutkonzentration = 1 dargestellt.

Man erkennt daraus, daß das Eindringen in die Erythrocyten um so schwerer erfolgt und daß das Verteilungsvolumen um so kleiner ist, je größer die Dissoziation der untersuchten Verbindung ist. Sulfaäthylthiodiazol hat zwar das gleiche p_K wie Sulfacarbamid, erreicht aber ein viel größeres Verteilungsvolumen, was offenbar auf die besonders günstigen Adsorptionsmöglichkeiten zurückzuführen ist, die für die Plasma-eiweißkörper nachgewiesen werden konnten. Die Dissoziation als Säure

Tabelle 3. Beziehung zwischen Verteilung und p_K .

Substanz	p_K	Verteilung auf die Blutphasen				Vert. Volumen % Körpergewicht
		Erythro- cyten- Eiweiß	Plasma- Eiweiß	Erythro- cyten- Wasser	Plasma- Wasser	
Sulfanilamid . . .	10,5	35 M	14	13	38	69,2 ± 3,7
		31 H	20	13	36	
Sulfathiazol . . .	7,1	36 M	28	6	30	55,7 ± 20,8
Sulfaäthylthiodiazol	5,3	12 M	65	6	17	56,1 ± 7,8
Sulfacarbamid . .	5,42	12 H	5	22	61	34,5 ± 1,03
Sulfanilsäure . . .	3,2	10 M	12	22	56	
		8 H	10	21	61	29 ± 1,4

M = Mensch (nach WITZGALL); H = Hund.

spielt bei Sulfanilamid und Sulfathiazol keine Rolle, wohl aber wird ihr Einfluß bei Sulfacarbamid deutlich und bei Sulfanilsäure sehr ausgesprochen. Das Verteilungsvolumen wird also durch die Ladung der Verbindung und seiner Adsorption an Eiweißkörper beeinflusst. — Eine Deutung der aus unseren Versuchen sich ergebenden unterschiedlichen Capillar-Permeabilität muß späteren Auseinandersetzungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung.

Die Fortsetzung unserer Verteilungsversuche hat folgendes ergeben: Sulfanilamid wird stark an Bluteiweißkörper adsorbiert, Sulfanilsäure und Sulfacarbamid verteilen sich bevorzugt auf die Wasserphase. Im zell- und eiweißarmen Liquor und Kammerwasser werden beim Sulfanilamid erst nach 120 min dem Ultrafiltrat entsprechende Konzentrationen erreicht, bei Sulfanilsäure und Sulfacarbamid betragen die Konzentrationen nach dieser Zeit nur $\frac{1}{16}$ bzw. $\frac{1}{7}$ der Plasma-Ultrafiltratkonzentrationen. In der Pericardflüssigkeit werden bei den untersuchten Verbindungen sehr rasch dem Plasma ähnliche Konzentrationen gefunden. Es kann daher Liquor und Kammerwasser für Diffusionsvorgänge als schwer und der Herzbeutel als leicht zugänglich angesehen werden. Die Behinderung der Diffusion in Liquor und Kammerwasser bei mäßig dissoziierten Verbindungen wird auf hemmende Einflüsse von Membranen zurückgeführt. Die geringere Permeabilität der Endothelien in Liquor- und Kammerwasserraum gegenüber Sulfanilsäure und Sulfacarbamid wird damit zu erklären versucht, daß diese dissoziierten Verbindungen als am Stoffwechsel nicht beteiligte Anionen an dem Sperrgitter der Membran einen Widerstand finden. Die Pericardendothelien werden als „geschädigte“, transudatbildende Zellage aufgefaßt, die dem Durchtritt der untersuchten Anionen nur unwesentlichen Widerstand entgegensetzen.

Literatur.

EICHLER, O.: Die Pharmakologie anorganischer Anionen. Handb. d. exper. Pharmakologie. Erg.-Werk X (1950). — GREENBERG, R. B., M. D. L. BOELTER, W. W. CAMPBELL, W. E. COHN u. M. M. MURYAMA: A study with radioactive isotopes of the permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier to ions. Amer. J. Physiol. **140**, 47 (1943). — LANGECKER, H.: (1) Die Verteilung von Sulfanilsäure und Sulfonamiden beim nierenlosen Hund. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 278 (1953). — (2) Über das Schicksal der Sulfonamide im Organismus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 367 (1950). — WITZGALL, H.: (1) Die Verteilung von körperfremden Stoffen im Blut und ihr Einfluß auf die Pharmakodynamik. Habil. Schrift, Berlin 1951. — (2) Die Blut-Liquorverteilung von Arzneimitteln an dem Beispiel der gebräuchlichsten Sulfonamide. Ärztl. Wschr. **8**, H. 27, S. 643.

Prof. Dr. HEDWIG LANGECKER,

Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin N 65, Müllerstr. 170/172.

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A. G. Berlin-West.

Die Verteilung von Hexamethylenetetramin auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.

Ein Beitrag zur Dynamik der Verteilung.

III. Mitteilung*.

Von

H. LANGECKER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 4. September 1953.)

Die bisher an Sulfonamiden als Modellsubstanzen ausgeführten Untersuchungen über Verteilungsvorgänge legten Versuche mit einer Base nahe. Es wurde für diesen Zweck Hexamethylenetetramin (I) gewählt, das exakt nachweisbar, sehr gut verträglich ist und unter den gegebenen Versuchsbedingungen als nahezu nicht reaktiv betrachtet werden kann. Wir untersuchten die Verteilung auf die Blutphasen in vitro und in vivo beim nierenlosen Hund sowie in Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit. I ist eine einsäurige, mäßig dissoziierte Base ($p_K = 5,1$)** vom Mol.-Gew. 140. Sie ist gut wasser-, alkohol- und chloroformlöslich, unlöslich in Äther. Der Verteilungsquotient Öl/Wasser beträgt 0,024. Eine Normallösung von I hat ein p_H von 9,5; hohe Wasserstoffionenkonzentration begünstigt den Zerfall in Formaldehyd und Ammoniak. In neutraler Lösung liegt die Spaltung bei 38° innerhalb 6 Std unter 1% (TRENDELENBURG). Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten wir im Blut niemals freien Formaldehyd nachweisen (bzw. unter 1% des vorhandenen I). Man nimmt an, daß die Formaldehydabspaltung in der Niere erfolgt und in der Blase zunimmt (SOLLMANN). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß in unseren Versuchen am nierenlosen Tier innerhalb von 120 min nennenswerte Formaldehydbildung eintritt. Für die ungünstigen Spaltbedingungen im Organismus spricht ja auch der große Toxizitätsunterschied zwischen I und Formaldehyd: LD 50 i. v. pro Kilogramm Ratte: I = 9,2 g (6 Tiere Dosenabstufung mit dem Faktor 1,4), Formaldehyd 0,087 g.

Methodik.

Bestimmung von I. Prinzip: im hämolysierten Blut wird bei p_H 2,5 der gebildete Formaldehyd im WIDMARK-Kölbehen bei 60° in chromogene Säure überdestilliert und die erhaltene Farbe gemessen.

* II. Mitteilung siehe 221, 160 (1954).

** Nach Bestimmungen von Herrn Dr. NEUDERT.

Reagenzien: 1. Chromogene Säure: 20 mg 1,8-Dihydronaphthalin-3,6-disulfosaures Natrium wurde in 0,4 Wasser gelöst und mit 15 Molar-Schwefelsäure auf 100 aufgefüllt. Die Lösung ist täglich frisch zu bereiten. 2. 1,5%ige Weinsäure.

Arbeitsgang: 0,1 cm³ Citratblut wird in dem Löffel eines WIDMARK-Kölbchens, das vorher mit 10 cm³ (1) beschickt worden war, eingefüllt und nach Zugabe von 1,9 cm³ (2) über Nacht bei 60° gehalten. Die Colorimetrie erfolgte im HAVEMANN-Colorimeter. Filter VG 2, die Formaldehyd-Standardkurve erstreckte sich über 2—15 γ. Zum Nachweis des freien Formaldehyds wurden 2 hintereinandergeschaltete Gefäße, von denen das erste 3 cm³ Blut und das zweite 0,5 cm³ (1) enthielt, bei Zimmertemperatur 1 Std lang mit Luft durchströmt. Unter diesen Bedingungen tritt in Gegenwart von 40 mg% I keine Formaldehydabspaltung ein, wohl aber lassen sich 0,5 mg% freier Formaldehyd im Blut noch nachweisen. Die Eiweißbestimmung in Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit wurde mit Amido-schwarz nach FUHR ausgeführt. Hinsichtlich der Verteilungsversuche in vitro und in vivo am nierenlosen Hund (100 mg pro Kilogramm I i. v.) vgl. Mitteilung I und II.

Aus der Tab. 1, in der die Verteilung von I in den in vivo-Versuchen entsprechenden Ausgangskonzentrationen auf die Blutphasen dargestellt ist (5 Versuche mit 4 verschiedenen Konzentrationen), ergibt sich eine ganz überwiegende Verteilung von I zugunsten der Wasserphase. Die Adsorption an Eiweiß ist sehr gering.

Tabelle 1. Verteilung von Hexamethylentetramin auf die Phasen des Hundeblutes in vitro.

mg % Blut	% der Gesamtmenge			
	Erythrocyten-Wasser	Erythrocyten-Eiweiß	Plasma-Eiweiß	Plasma-Wasser
44,6	25,8	4,5	5,5	66,2
33,0	23,9	3,3	1,8	72,4
22,5	25,7	1,3	2,4	70,7
10,5	24,0	0,0	5,6	70,7

In der Tab. 2 ist der Blutkonzentrationsabfall dargestellt. Das Verteilungsgleichgewicht ist nach 50 min erreicht mit einem Verteilungsvolumen von 55,8% ($\pm 3,3$). In den ersten 10 min werden 50% des verfügbaren Raumes eingenommen, nach 30 min 80%. In je einem orientierenden Versuch mit der halben und doppelten Konzentration lagen die Konzentrationsabläufe sehr ähnlich. In der Tab. 2 sind auch die Konzentrationen in Blut-, Plasma-Ultrafiltrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit zusammengestellt. Die Ultrafiltratwerte sind aus der in vitro-Verteilung errechnet. Im Liquor steigen die Konzentrationen langsam bis auf etwa 30% des Plasma-Ultrafiltrats an, im Kammerwasser erfolgt der Anstieg etwas rascher und erreicht etwa 50% der Ultrafiltratkonzentration, die Konzentration in der Pericardflüssigkeit hingegen gleicht nach 120 min denen im Ultrafiltrat.

In der Abb. 1 sind die Konzentrationsabläufe im Blut, Ultrafiltrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit zueinander in Beziehung

Tabelle 2. Hexamethylentetramin-Konzentrationsablauf in Blut, Ultra-Filtrat, Verabreichung

Minuten	mg% (m $\pm$ e) in Klammer			
	2	5	10	20
Blut	43,6 $\pm$ 3,5 (9)	29,4 $\pm$ 2,6 (9)	23,7 $\pm$ 1,3 (11)	20,2 $\pm$ 1,3 (10)
Ultra-Filtrat. .	54,5 $\pm$ 3,0 (8)	38,5 $\pm$ 3,9 (9)	31,2 $\pm$ 1,9 (11)	26,0 $\pm$ 1,8 (10)
Liquor	0,2 (1)	0,5 (1)	1,8 (1)	1,4 $\pm$ 0,6 (2)
Kammerwasser.	2,9 (1)	5,8 (1)	3,6 (1)	6,6 (1)
Pericard.			8,2 (1)	
Vert. Vol				
% Körp.-Gew..				

gesetzt, indem die Blutkonzentration nach 120 min, dem Verteilungsgleichgewicht entsprechend, gleich 1 gesetzt wurde. I verteilt sich bevorzugt auf die Wasserphasen des Blutes. Der Anteil im Erythrocytenwasser erreicht fast die Hälfte der Blutwasserphase. Bei kaum vorhandenen Adsorptionsmöglichkeiten dringt Urotropin gut in die Erythro-

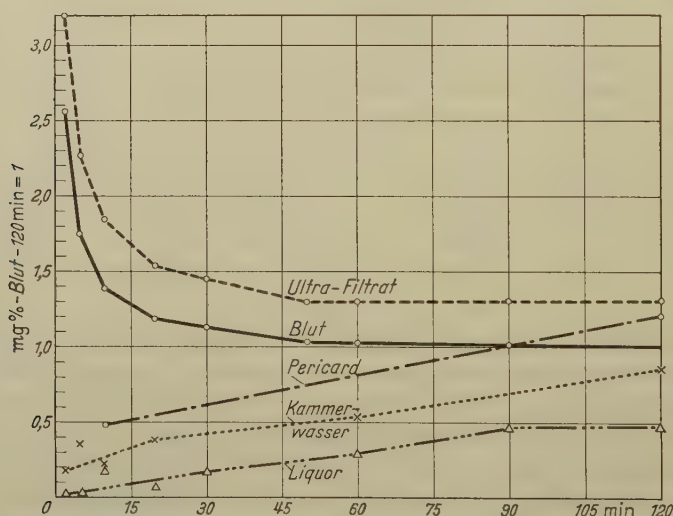


Abb. 1. Hexamethylentetramin-Konzentrationsablauf in Blut, Plasma-Ultra-Filtrat, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund nach i. v. Verabreichung von 100 mg/kg. Die Konzentrationen wurden im Verhältnis zur nach 120 min erreichten Blutkonzentration = 1 dargestellt.

cyten ein. Wenn man auch Verteilungsbefunde, die an den Blutphasen gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im Gewebe übertragen kann, so muß man doch aus dem relativ großen Verteilungsvolumen annehmen, daß auch die Gewebsflüssigkeit-/Zellgrenzflächen für I leicht überschreitbar sind. In den Subarachnoidalraum tritt I relativ

Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund nach i. v. 100 mg/kg.

Die Zahl der Versuche

30	50	60	90	120
19,1 ± 1,2 (10)	17,3 ± 0,6 (3)	18,5 ± 1,5 (8)	17,1 ± 1,0 (10)	17,0 ± 0,08 (10)
24,4 ± 1,7 (10)	22,0 ± 1,0 (3)	23,5 ± 2,0 (8)	22,0 ± 1,3 (10)	22,0 ± 1,2 (10)
3,3 ± 0,22 (3)		5,5 ± 0,22 (3)	8,1 ± 1,5 (3)	7,9 ± 0,7 (8)
		9,3 (1)		14,6 ± 0,7 (8)
				21,0 ± 0,95 (6)
				55,8 ± 3,3

langsam ein und erreicht nach 120 min nur die Hälfte der Plasma-Ultrafiltratkonzentration, so daß man für diese Grenzfläche ein Membranhindernis einer mäßig dissoziierten Base gegenüber annehmen muß. I dringt aber leichter ein als das mäßig dissoziierte Anion Sulfacarbamid. In die Vorderkammer erfolgt der Eintritt etwas rascher. Als zell- und eiweißarme Flüssigkeiten werden Liquor und Kammerwasser kaum Adsorptionsmöglichkeiten bieten, und man müßte in beiden Flüssigkeiten dem Ultrafiltrat entsprechende Konzentrationen erwarten. Da dies nicht zutrifft, muß man eine Verteilung über einen Diffusionsvorgang annehmen, der durch Membraneinflüsse verzögert wird. Das transudatliefernde Pericard-Endothel ist stärker durchlässig und setzt dem Eindringen von I keinen Widerstand entgegen. Da I kaum adsorbiert wird, war auch nicht zu erwarten, daß das Eindringen von Adsorptionsmöglichkeiten in den Flüssigkeiten abhängt. Damit stimmt auch die mangelnde Parallelität zwischen Eiweißgehalt der Flüssigkeiten (der nur zum geringsten Teil auf

Tabelle 3. *Beziehung zwischen Hexamethylentetraminkonzentration und Eiweißgehalt.*

mg %					
Liquor		Kammerwasser		Pericard	
I	Eiweiß	I	Eiweiß	I	Eiweiß
0,8	22,5	3,6	32,0	19,7	1250
2,0	38,1	6,6	12,5	19,8	1125
3,0	10,60	9,3	2,7	20,6	2120
3,15	182,0	14,0			
3,7	59,0	12,5	8,1		
4,65	199,0	13,1	25,0		
5,2	187,0				
6,6	186,0				
6,8	59,0				
7,4	160,0				
8,1	138,0				
8,2	83,0				

kleine Blutbeimengungen zurückzuführen ist) und erreichter I-Konzentration (Tab. 3). Es spricht dafür, daß die Beschaffenheit der Membran die Dynamik entscheidend beeinflußt.

Es erfolgt demnach die Filtration des nicht reaktiven, mäßig dissoziierten Kations I durch die Endothelien mit einer gewissen Selektivität, was Konzentrationsdifferenzen zwischen Gewebsflüssigkeit und Blutwasser hervorruft, die sich von der gegenüber mäßig dissoziierten Anionen unterscheidet. Sie ähnelt in der Verteilung dem nahezu neutralen Molekül des Sulfanilamids. Ob hierfür Potential und Vorzeichen der Ladung oder Größe und Gestalt des Moleküls oder Lipoidlöslichkeit maßgeblich sind, bleibt offen. Für die Bedeutung des Vorzeichens der Ladung spricht das unterschiedliche Verhalten der beiden Ionen Sulfacarbamid und I, die annähernd gleiche Dissoziation zeigen. Die Versuche bedürfen einer Erweiterung durch die Prüfung einer nicht reaktiven starken Base.

Zusammenfassung.

Es wurde die Verteilung von Hexamethylentetramin (I) auf die Phasen des Hundesblutes in vitro untersucht und am nierenlosen Hund der Konzentrationsablauf im Blut, Liquor, Kammerwasser und Ultrafiltrat ermittelt. I verteilt sich ganz besonders auf die wäßrigen Phasen. In den Liquor tritt I langsam ein, etwas rascher in das Kammerwasser und am raschesten in die Pericardflüssigkeit. Zwischen Eiweißgehalt und erreichten Konzentrationen besteht keine Parallelität. Die Verteilung von I, eines mäßig dissoziierten, nicht reaktiven Kations unterscheidet sich von der des mäßig dissoziierten Sulfacarbamid-Anions.

Frau BREITKREUZ und Herr BUCHWALD haben bei der Durchführung der Versuche wertvolle Hilfe geleistet.

Literatur.

FUHR, J., u. OTTO-SÜEL HINZ: Eine einfache colorimetrische Methode zur Liquoreiweißbestimmung. *Klin. Wschr.* **1953**, 153. — LANGECKER, H.: (1) Die Verteilung von Sulfanilsäure u. Sulfonamiden beim nierenlosen Hund. Ein Beitrag zu den Gesetzmäßigkeiten von Verteilungsvorgängen im Körper. I. Mitt. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **218**, 278 (1953). — (2) Die Verteilung von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und Sulfacarbamid auf die Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund. *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* (im Druck). — SOLLMANN, T.: *A Manual of Pharmacology and its Applications to Therapeutics and Toxicology*. Philadelphia and London: Saunders Comp. 1949. — TRENDLENBURG, P.: Quantitative Messungen über die Spaltung des Hexamethylentetramins. *Biochem. Z.* **95**, 146 (1919).

Prof. Dr. HEDWIG LANGECKER,
Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin N 65, Müllerstr. 170/172.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. G. KUSCHINSKY).

Über die Vorzüge der Verwendung von Ratten-Uteri im Proöstrus zur Auswertung von Oxytocin.

Von

MARTHA FLATTERS.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. September 1953.)

Zur Aktivitätsbestimmung von Hypophysenhinterlappenextrakt (HHL) verwendeten BEARVILLAIN und kürzlich HOLTON Rattenuteri. Wir übernahmen zunächst die von BURN beschriebene Methode, die auf der Arbeit von HOLTON fußt. Dabei zeigten sich die gleichen Schwierigkeiten, die HOLTON und BURN beschreiben: Die Uteri kontrahierten sich spontan oder waren sehr unempfindlich. Das Verhältnis der brauchbaren zu den unbrauchbaren Organen gestaltete sich bei unserer Arbeit aber ungünstiger als HOLTON und BURN angeben. Die Organe zeigten in situ oft ein sehr verschiedenes Aussehen. Die sich spontan kontrahierenden Uterushörner hatten eine gute Gefäßzeichnung, waren wäßrig aufgequollen und durchscheinend. Die unempfindlichen Organe fanden wir blaß, fadenförmig dünn und ohne auffallende Gefäßzeichnung. Wir untersuchten daher die Brauchbarkeit des Rattenuterus in jedem Zyklusstadium der Tiere.

Methodik.

Wir verwendeten die Methode von HOLTON. Die Zyklusstadien wurden durch Scheidenabstriche bestimmt. Die Ratten wogen 140—200 g. Als Standardpräparat diente Hypophysin „Hoechst“ (3 VE/cm^3)*. Die Testdosen, ausgedrückt in mE/10 cm^3 ($1 \text{ mE} = 1/1000 \text{ VE}$), wurden in regelmäßigem Intervall von 8 min gegeben. Die Badtemperatur betrug 32°C . Die Versuche wurden während der Monate Juli—Oktober durchgeführt. Während der Wintermonate Dezember und Januar ruhte der Zyklus der Ratten fast völlig. Die Testung war dadurch sehr erschwert.

Ergebnisse.

Abb. 1—5 zeigen die verschiedenen Reaktionen der Organe auf HHL im Metöstrus, Diöstrus, Proöstrus und Östrus.

* Wir danken den Farbwerken Hoechst für die freundliche Überlassung von Hypophysin.

Aus den Abbildungen ist folgendes zu ersehen:

a) Die Empfindlichkeit der Uteri ist im Metöstrus gering und nimmt während des Diöstrus und Proöstrus kontinuierlich zu.

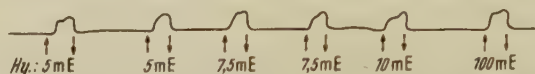


Abb. 1. Rattenuterus in modifizierter LOCKE-Lösung; Badtemperatur 32° C; Zyklusstadium: Metöstrus; Tiergewicht: 150 g; mE/10 cm³ Badflüssigkeit.

b) Im Metöstrus ist das Organ wegen großer Unempfindlichkeit zur Auswertung ungeeignet. Selbst große Dosenunterschiede sind in der Reaktion des Organs nicht zu erkennen.

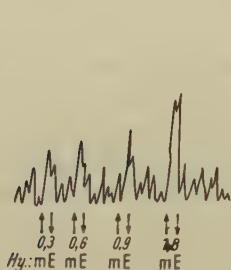


Abb. 2. Rattenuterus in modifizierter LOCKE-Lösung; Badtemperatur 32° C; Zyklusstadium: Diöstrus; Tiergewicht: 165 g; mE/10 cm³ Badflüssigkeit.



Abb. 3. Rattenuterus in modifizierter LOCKE-Lösung; Badtemperatur 32° C; Zyklusstadium: Proöstrus; Tiergewicht 155 g; mE/10 cm³ Badflüssigkeit.

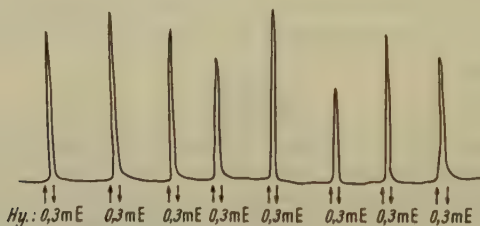


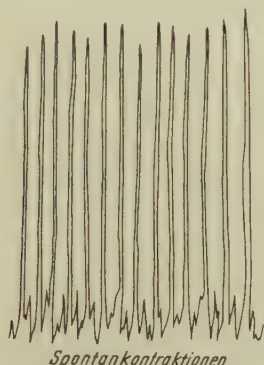
Abb. 4. Rattenuterus in modifizierter LOCKE-Lösung; Badtemperatur 32° C; Zyklusstadium: Proöstrus/Östrus; Tiergewicht: 190 g; mE/10 cm³ Badflüssigkeit.

c) Während des Östrus erschweren die Spontankontraktionen die Testung.

d) Die besten Versuchsbedingungen sind im Proöstrus gegeben. Dann hat das Organ eine gute Empfindlichkeit und keine störende Spontanrhythmik. Während 2—3 Std ist die Größe der Kontraktionen auf verschiedene HHL-Dosen ziemlich konstant.

e) Im Übergangsstadium vom Proöstrus zum Östrus sind die Reaktionen auf gleiche HHL-Dosen ungleich und deshalb unzuverlässiger.

An 14 Organen wurden im Proöstrus verschiedene HHL-Dosen getestet (von 0,1 mE bis 1,6 mE). Die Höhen der Kontraktionen wurden in den jeweils aufgezeichneten Kurven gemessen und in Millimeter angegeben. Alle Effekte, die mit einer gleichstarken Dosis an einem Präparat erzielt worden waren, wurden zu ihrem arithmetischen Mittelwert vereinigt. Mit 0,3 mE erhält man bei jedem Organ im Proöstrus eine mittel-



Spontankontraktionen

Abb. 5. Rattenuterus in modifizierter LOCKE-Lösung; Badtemperatur 32° C;
Zyklusstadium: Östrus; Tiergewicht: 180 g; mE/10 cm³ Badflüssigkeit.

große Kontraktion. Dieser Effekt wurde deshalb als Standardeffekt betrachtet, auf den bei jedem einzelnen Uterushorn alle anderen Effekte bezogen wurden. Aus rechnerischen Gründen haben wir dabei den Standardeffekt = 40 gesetzt. War der arithmetische Mittelwert, der mit der Standarddosis erzielten Effekte $a = 29$ mm, der arithmetische Mittelwert aller Kontraktionshöhen einer Testdosis $b = 45$ mm, so verhält sich $a:b$ wie $40:x$. Dann ist der neue Wert für die Effekte der Testdosis

$$x = \frac{40 \cdot b}{a} = \frac{40 \cdot 45}{29} = 62.$$

Diese Maßnahme macht es möglich, die an verschiedenen Uterushörnern gewonnenen Dosiswirkungskurven zu vereinigen.

In Abb. 6 sind alle erhaltenen Werte in ein Wahrscheinlichkeitsnetz eingezeichnet. Nach der Methode von LITCHFIELD und WILCOXON wurde innerhalb der „Punktstraße“ eine Gerade durch den Punkt des Standardeffektes gelegt. Die Lage der Geraden wurde so gewählt, daß bei Prüfung mit dem Chi²-Test die Verteilung der Werte einer Normalverteilung möglichst angenähert ist. Chi² für unsere Gerade in Abb. 6 ist gleich 4,04 bei 13 Freiheitsgraden. Dieser Wert ist wesentlich kleiner als der Tabellen-

wert 22,36¹ für $p = 0,05$, d. h. die Daten sind nicht signifikant heterogen. Die confidence limits des Standardeffektes sind dann 0,29 (untere Grenze) bis 0,53 (obere Grenze), die der Neigungsfunktion der Geraden 1,8 (untere Grenze) bis 3,94 (obere Grenze) für 19/20 Wahrscheinlichkeit. Aus der Abb. 6 ersieht man außerdem, daß der Dosenbereich von 0,25 mE bis 0,6 mE für die Testung am geeignetsten ist. Diese Gerade kann als Eichkurve benutzt werden, um die Aktivität von HHL unbekannter Konzentration schnell in den angegebenen Grenzen zu bestimmen. Es ist

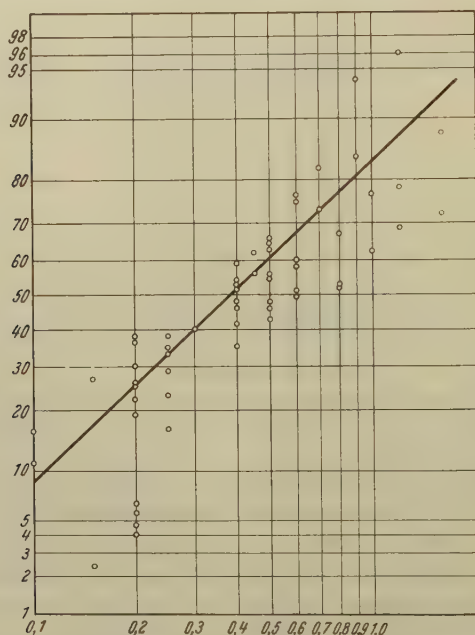


Abb. 6. Eichkurve. Ordinate: Arithmetische Mittelwerte der Kontraktionshöhen bezogen auf Standardeffekt (0,3 mE) = 40 gesetzt. Abszisse: Log. Dos (in mE).

erforderlich, die Standarddosis 0,3 mE nicht nur zu Beginn der Untersuchung, sondern auch alternierend zwischen den Testdosen eines unbekannten Extraktes zu geben. Die Auswertung würde sich wie folgt gestalten:

a) Die Effekte jeder einzelnen Testdosis und der Standarddosis werden jeweils zu ihrem arithmetischen Mittelwert vereinigt.

b) Der arithmetische Mittelwert des Standardeffektes wird gleich 40 gesetzt. Die arithmetischen Mittelwerte der Testdosen werden darauf bezogen wie oben angegeben.

¹ Aus Tafel III von R. A. Fishers Statistical Methods for Research Workers, Oliver & Boyd, Ltd., Edinburgh.

Rechenbeispiel: Arithmetischer Mittelwert des Standarddeflektes $a = 34$ mm. Arithmetischer Mittelwert der Effekte einer Testdosis $b = 57$ mm. Daraus wird der Wert errechnet, für den man in der Eichkurve die Aktivität in mE ablesen kann:

$$x = \frac{40 \cdot b}{a} = \frac{40 \cdot 57}{34} = 67.$$

Dieser Wert entspricht einer HHL-Dosis von 0,59 mE.

Diskussion.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß man am Rattenuterushorn im Proöstrus am besten die Wirksamkeit von HHL unbekannter Konzentration bestimmen kann. Die von HOLTON und BURN beschriebenen Schwierigkeiten treten nicht auf. Jedes reife, virginelle Tier im Gewicht von 140—200 g war im Proöstrus zur Testung geeignet. Die gute Empfindlichkeit des Organs gegenüber HHL ermöglicht auch den Nachweis kleiner oxytocischer Aktivitäten. Da die Empfindlichkeit der Uterushörner im Proöstrus stets im gleichen Dosenbereich lag, und darüber hinaus die Reaktionen auf verschiedene HHL-Dosen während 2—3 Std konstant blieben, konnten wir eine Eichkurve festlegen. Mit Hilfe dieser Kurve ließen sich HHL-Extrakte unbekannter Konzentrationen schnell und einfach bestimmen.

Wegen der kurzen Dauer des Proöstrus (1—3 Std) kontrollierten wir täglich den Zyklus von 15—20 Ratten. Am Versuchstag selbst prüften wir zunächst nur die Tiere, bei denen man einen Proöstrus erwarten konnte, um das Zeitintervall zwischen Scheidenabstrich und Tötung der Testtiere möglichst kurz ($\frac{1}{2}$ Std) zu halten.

Nach Abschluß dieser Arbeit fanden wir eine neue Methode zur biologischen Standardisierung von HHL von H. KUMAGAI, S. EBASHI und E. TAKEDA. Sie arbeiteten mit Rattenuteri im Diöstrus. Um die dann auftretenden störenden Spontanbewegungen auszuschalten, wählten sie subnormale Temperaturen (um 20° C). Als Empfindlichkeitsmaß diente ihnen ebenfalls die jeweils aufgezeichnete Kontraktionshöhe. Sie soll gegenüber der Organempfindlichkeit bei höheren Temperaturen (30—38° C) gleichbleiben oder sogar größer werden. Arbeiteten wir mit unserer Versuchsanordnung bei 20° C, so sahen wir eher ein Unempfindlicherwerden der Organe. Um die gleiche Kontraktionshöhe zu erzielen, mußte wiederholt die zehnfache Dosis gegeben werden. Es erwies sich aber als vorteilhaft, an Organen, die erst bei Übergang vom Proöstrus zum Östrus entnommen wurden, bei subnormalen Temperaturen zu arbeiten. Diese Uterushörner zeigen nämlich manchmal bei 32—35° C eine sehr geringe Breite zwischen Schwellendosis und der Dosis, die bereits eine maximale Kontraktion hervorruft. Eine grob orientierende Testung war dann an diesem Versuchsmaterial möglich. Da im Proöstrus keine störende Spontanrhythmik auftritt, brauchten wir aus diesem Grunde nie die Temperatur zu erniedrigen, konnten aber an sehr empfindlichen Organen arbeiten.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß Rattenuteri im Proöstrus zur Testung von Hypophysenhinterlappenextrakten am besten geeignet sind. Die in der Methode von HOLTON zur Standardisierung von Oxytocin beschriebenen

Schwierigkeiten treten nicht mehr auf. Darüber hinaus reagiert jedes Organ in diesem Zyklusstadium so regelmäßig, daß sich eine Eichkurve festlegen ließ, an Hand derer unbekannte Oxytocinaktivitäten bestimmt werden können. Für die Eichkurve sind Genauigkeitsgrenzen angegeben.

Literatur.

BEARVILLAIN, A.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **137**, 284 (1943). — BURN, J. H., J. P. FINEY and L. G. GOODWIN: Biological Standardization, Oxford, Medical Publications, Oxford University Press, London, New York, Toronto 1950.
HOLTON, P.: Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948). — KUMAGAI, H., S. EBASHI u. F. TAKEDA: Japan. J. Pharmacol. **2**, 65 (1952). — LICHTFIELD, J. T., and F. WILCOXON: J. Pharmacol. **96**, 99 (1949).

Dr. MARTHA FLATTERS, Ginsheim/Hessen, Dammstr. 8—10.

Aus der II. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. GUSTAV VON BERGMANN)
und aus der I. Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. K. BINGOLD) der Universität München.

Über die Beziehungen zwischen arteriellem Kreislauf und Nierenfunktion unter der Wirkung von Hexamethoniumbromid.

Von

W. SCHIMMLER und H. SCHWALB.

(Eingegangen am 1. September 1953.)

Das Hexamethoniumbromid (HMBR) gehört chemisch in die Gruppe der quarternären Ammoniumverbindungen, deren pharmakologische Wirkung im Sinne einer Blockade der autonomen Ganglien erstmals von BURN und DALE nachgewiesen wurde. In der chemischen Konstitutionsformel sind beim Hexamethoniumbromid zwei quarternäre Stickstoffgruppen durch eine Kette von 6 CH_2 -Gruppen verbunden. PATON und Mitarbeiter sahen bei elektrischer Reizung der präganglionären Nervenfasern, daß bei Anwesenheit von Hexamethonium das an den präganglionären Nervenendigungen freiwerdende Acetylcholin nicht mehr zu einer Erregung der postganglionären Fasern führt.

Man nimmt nämlich an, daß Acetylcholin an den präganglionären Nervenendigungen freigesetzt wird und auf eine erregbare Ganglienzelle treffen muß, um die Erregung von der präganglionären auf die postganglionäre Faser zu übertragen. Es wären somit verschiedene Möglichkeiten vorhanden, die Wirkung des Acetylcholins zu blockieren. Durch Procain oder Calcium kann die *Freisetzung* von Acetylcholin verhindert werden. Von Acetylcholin bei höherer Dosierung und von Nicotin wird eine Depolarisierung der Ganglienzelle angenommen, so daß das freigesetzte Acetylcholin auf eine refraktäre Phase der Ganglienzelle trifft.

Die Hauptvertreter der unter dem Begriff „Ganglienblocker“ zusammengefaßten Stoffe, wie das Curare, das Tetraäthylammonium und das Hexamethonium wirken nach den Untersuchungen von BROWN und FELDBERG und PATON und PERRY durch Besetzung der spezifischen Receptorguppen oder der Membran der Ganglienzelle, wodurch später freiwerdendes Acetylcholin seinen Angriffspunkt verliert („block by competition“). Neue Untersuchungen von KEWITZ und REINERT zeigen jedoch wesentliche Differenzen auf zwischen der durch Acetylcholin und der durch präganglionäre Reizung erzeugten Erregung, so daß neben den Bedenken gegen die Theorie der Erregungsübertragung durch Acetylcholin in der Synapse auch die Möglichkeit einer anderen Deutung des Wirkungsmechanismus der Ganglienblocker bestünde.

Die Hemmung der Erregungsübertragung von der präganglionären Faser auf die ganglionäre Schaltstelle kommt somit einer Blockade sowohl des cholinergisch-histotropen als auch des adrenergisch-ergotropen Systems gleich. Beweisend dafür sind ausgedehnte pharmakologische Untersuchungen der Wirkung der C_6 -Verbindungen auf die Nickhaut der Katze, die Speicheldrüsen, die Mesenterialganglien und auf die Regulatoren des Blutdrucks.

Die durch das Tetraäthylammonium und durch die Methoniumverbindungen zu erzielende Blutdrucksenkung spielt bisher die praktisch wichtigste Rolle. Der eine

von uns konnte nachweisen, daß eine zum Teil beträchtliche Senkung des Minutenvolumens an der Herabsetzung des Druckes durch die C₆-Verbindungen beteiligt ist, besonders wenn dieses schon in Ruhe über die Norm erhöht war (SCHIMMLER und ZIMMERMANN). Möglicherweise ist die Reduzierung des Herzminutenvolumens durch eine Abnahme des venösen Rückstroms zum Herzen infolge eines Tonusverlustes des venösen Kreislaufschenkels bedingt (SCHIMMLER und BLÖMER).

Da MACKINNON, BLAINLEY und HAUGEN und BLEGEN unter der Wirkung von Hexamethonium an Gesunden und nierenkranken Patienten mit Hochdruck häufig eine Abnahme der Nierendurchblutung fanden, wollten wir auf Grund von Versuchen, bei denen die Änderungen der Kreislaufdynamik und der Nierenfunktion gleichzeitig erfaßt werden, die Frage klären, ob die Hexamethoniumverbindungen einen isolierten Angriffspunkt auf die Nierenfunktionen besitzen oder inwieweit diese durch eine Änderung der Kreislaufdynamik beeinflußt werden können. So ist es bekannt, daß die Bildung des Harns in den Glomeruli z. B. von physiologischen Blutdruckschwankungen beeinflußt wird. Eine Störung der Nierenfunktion durch die extrarenale Kreislaufdynamik wäre aber besonders dann zu erwarten, wenn von vornherein die Nierendurchblutung und das Glomerulusfiltrat verringert sind, wie z. B. bei den Nephrosklerosen.

Methode.

Die Kreislaufanalysen wurden mit der sphygmographischen Methode der O. FRANKSchen Schule durchgeführt. Der Nierenplasmastrom, der einen Rückschluß auf die Nierendurchblutung erlaubt, wurde mit der p-Aminohippursäure-Clearance nach SMITH bei einer konstanten Plasmakonzentration von 2–3 mg% p-Aminohippursäure bestimmt. Die Versuchsperson erhielt 5 cm³ Nephrotest „Casella“ intravenös, nach 20 min eine Lösung von 2 g Nephrotest in 300 cm³ 5,7%iger Traubenzuckerlösung als i. v. Dauertropfinfusion, 25 Tropfen pro Minute. 30 min nach Infusionsbeginn wurde das erste Mal Blut abgenommen. Vor Beginn des Versuches wurden 250 cm³ Flüssigkeit zu trinken gegeben, anschließend alle 20 min 50 cm³. Die Bestimmung des Glomerulusfiltrates erfolgte nach der Methode der endogenen Kreatininclearance nach POPPER und MANDEL. Die Harnstoffausscheidung wurde nach dem Clearance-Prinzip von VAN SLIKE berechnet. Zur Bestimmung der Chloride wurde die Methode von VOLHARD herangezogen.

Versuchsanordnung.

Es wurden 15 Patienten untersucht. Vorzugsweise wählten wir Hypertoniker, da erfahrungsgemäß der Effekt der Ganglienblocker auf den Mitteldruck bei ihnen am deutlichsten ist. Alle Versuchspersonen waren nüchtern. Nach Anlegen der Pulsabnahmekapseln, nach Beginn der Infusion und Legen des Verweilkatheters vergingen 20 min bis zur ersten Blutentnahme. Während der ersten beiden Perioden (von nochmals je 20 min Dauer) wurden mehrere Pulswellenschreibungen vorgenommen; bis zum Anfang der zweiten Periode hatten sich die Versuchspersonen meist an die einzelnen Manipulationen gewöhnt, so daß man unter der 2. Periode Ruhebedingungen annehmen kann. Die Injektion des Hexamethoniumbromids erfolgte intramuskulär, da der Blutdruck bei i. v. Injektion zu abrupt abfällt, und zwar stets am Wechsel von der 2. zur 3. Periode. In der 3. und 4. Periode wurden nochmals jeweils 3–5 Pulswellenregistrierungen aufgezeichnet, um einen Durchschnittswert der kreislaufdynamischen Veränderungen erfassen zu können.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt.

1. Die Wirkung des Hexamethoniumbromids auf den arteriellen Kreislauf: Im akuten Versuch ist eine Drucksenkung prinzipiell in jedem Falle zu erreichen. Es ist dies nur eine Frage der Dosierung. Bei gleicher Dosis spricht ein hoher Blutdruck schneller und stärker an, als ein normaler. Die Genese der Hypertonie tritt dabei an Bedeutung in den Hintergrund. Der systolische Blutdruck sinkt prozentual meist stärker ab, als der diastolische. Da die Blutdruckamplitude als annäherndes Maß für die Füllung des Gefäßsystems gelten kann, ist daraus zu schließen, daß die pro Zeiteinheit durchströmende Blutmenge kleiner wird, falls der elastische Widerstand gleichbleibt, zumindest aber nicht wesentlich abnimmt. Von den 10 deutlich mit einer Blutdruckabnahme reagierenden Fällen ist dieser 5 mal unverändert, bei 2 Versuchspersonen steigt er an und nimmt nur bei 3 ab. Entsprechend der Reduzierung der Pulsdruckamplitude kommt es bei 9 Versuchspersonen zu einer Abnahme des Schlag- und Minutenvolumens (Fall 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14 und 15). Das Ausmaß des Minutenvolumenabfalls ist ähnlich wie beim Mitteldruck abhängig von der Ausgangshöhe. Hohe Minutenvolumina können beträchtlich, schon auf eine relativ kleine Dosis hin, absinken, solche, die schon zu Anfang auffallend klein sind, erleiden kaum eine Veränderung. Mehrmals kam es zu einem deutlichen Anstieg der Frequenz, der sowohl periodisch sein, als auch längere Zeit dauern kann. Eine Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Ausgangslage ist nicht mit Sicherheit festzustellen. Trotzdem der Mitteldruck meist absinkt, kommt es doch zu einem Anstieg des mathematisch errechneten peripheren Widerstands, da die Schlag- und Minutenvolumenabnahme die des arteriellen Mitteldrucks überwiegt.

Durch Pervitin (Fall 13 u. 15) kann der Effekt des HMBR wieder aufgehoben werden: Innerhalb von 10—15 min steigt der Mitteldruck und das Schlag- und Minutenvolumen wieder an.

2. Die Wirkung auf die Nierenfunktion: Der Nierenplasmastrom verringerte sich nach Injektion des HMBR bei 10 Versuchspersonen, 9 mal kam es zu einer deutlichen Abnahme des Glomerulusfiltrats, prozentual gesehen manchmal in einem größeren Ausmaß, als es bei der Nierendurchströmung der Fall war. Auch die Harnmenge ging in 7 Fällen erheblich zurück, wobei dieser Effekt nicht von der Größe des vorangehenden Harnvolumens abhängig war. Die Abnahme der Harnausscheidung war dabei fast immer mit einem Rückgang des Glomerulusfiltrates verbunden. Außerdem stellten wir in der Mehrzahl der Fälle eine Steigerung der Wasserrückresorption in den Tubuli fest. Infolgedessen ist die Abnahme der Harnausscheidung sowohl auf einen Rückgang der Filtratmenge, als auch auf eine prozentual vermehrte tubuläre

Tabelle 1.

Name Alter Protokoll-Nr.	P	$p_s p_d$	P_m	V_s	F_r	V_M	E'	W	Hv	C_p	C_k	C_{Cl}	C_U	Dosis in mg i. m.
1. S. ♀ 24 Jahre 887/53	I II III	120/ 90 130/ 90 127/102	105 105 114	29 26 26	90 91 100	2,61 2,39 2,60	1058 1150 1056	3229 3510 3520	1,4 563 3,8 476 3,0 581	80 70 82	0,3 0,2 0,3	77 64 77	←	40
2. S. 24 Jahre 868/53	I II III IV	130/105 130/105 130/107 132/110	117 117 118 121	30 28 26 24	57 56 68 66	1,71 1,59 1,77 1,58	794 826 854 880	5500 5920 5372 5996	6,1 402 8,8 404 9,7 402 4,7 380	80 72 68 67	1,3 1,6 2,1 2,3	55 56 — 66	←	15
3. W. 29 Jahre 864/53	I II III IV	120/ 80 120/ 80 100/ 77 116/ 85	100 100 88 100	40 38 27 33	85 82 101 96	3,42 3,07 2,72 3,17	1005 1055 930 985	2340 2610 2866 2702	1,3 313 1,4 419 1,2 358 0,8 285	64 70 67 66	1,1 1,2 0,9 0,4	28 38 51 31	←	25
4. H. 18 Jahre 882/53	I II III	145/115 145/115 142/113	130 130 127	34 26 31	91 92 99	3,11 3,26 3,06	990 970 1089	3350 3190 3154	8,6 481 6,8 510 4,3 513	128 134 127	2,8 2,9 3,0	88 88 81	←	20
5. W. 56 Jahre 828/53	I II III IV	155/ 85 140/ 90 140/ 87 133/ 90	120 115 113 111	111 90 64 36	63 57 68 82	7,00 5,15 4,36 2,95	617 523 819 1217	1370 1790 2186 3070	3,2 474 11,4 501 12,8 382 12,8 370	135 132 145 148	3,0 3,2 2,2 1,9	109 95 58 58	←	20 15
6. Sc. 31 Jahre 884/53	I II III	200/130 200/130 196/130	165 165 163	82 82 75	73 72 73	5,94 5,88 5,47	899 888 940	2220 2250 2508	4,6 322 3,1 313 2,4 298	87 83 87	0,7 0,6 0,6	41 40 40	←	30
7. Gr. 46 Jahre 840/53	I II III IV	210/125 210/125 190/125 180/120	167 171 157 150	53 71 — 37	77 77 — 73	4,08 5,46 — 2,70	1600 1200 — 1520	3280 2450 — 4475	1,3 156 2,7 137 2,5 126 0,9 78	49 38 31 20	0,6 0,6 0,3 0,2	18 22 17 9	←	30
8. Dr. 60 Jahre 818/53	I II III IV V	220/120 220/125 181/107 157/ 88 138/ 83	170 172 144 127 110	86 81 51 37 41	94 98 89 85 72	8,10 7,93 4,55 3,14 2,95	1292 1331 1536 1588 1298	1698 1740 2610 3182 3027	1,4 — 1,0 349 1,6 359 1,2 362 0,7 238	— 90 108 108 58	1,6 1,2 1,9 1,1 0,2	39 14 16 13 5	←	15 15 15
9. Dr. 60 Jahre 841/53	I II III IV	210/125 200/125 168/100 153/ 93	167 162 134 123	52 42 — 45	110 107 — 101	5,75 4,46 — 4,54	1895 2120 — 1419	2330 2920 — 2260	0,7 187 0,6 179 0,4 128 0,4 170	59 65 42 69	0,9 1,0 0,4 0,3	17 — 7 12	←	15
10. M. S. 58 Jahre 830/53	I II III IV	240/140 240/140 151/ 90 139/ 88	190 190 120 113	70 70 32 44	72 76 78 70	5,08 5,35 2,50 3,08	1460 1468 1963 1174	2990 2850 3897 3028	7,6 — 3,4 283 0,3 105 0,3 178	70 74 29 63	5,8 3,4 0,3 0,1	74 36 4 7	←	50
11. S. 46 Jahre 889/53	I II III	265/150 250/150 215/138	207 200 176	83 60 48	104 103 108	8,57 6,20 5,18	1528 1755 1793	1935 2580 2904	1,6 256 4,3 — 2,3 274	84 98 71	0,6 0,7 0,4	47 52 41	←	50

Tabelle 1. (Fortsetzung.)

Name Alter Protokoll-Nr.	P	p_s/p_d	P_m	V_S	Fr	V_M	E'	W	Hv	C_p	C_k	C_{Cl}	C_U	Dosis in mg i. m.
12. S. 46 Jahre 835/53	I	300/160	230	80	90	7,20	1850	2560	4,5	258	79	2,3	57	30 40
	II	300/160	230	70	89	6,20	2070	2970	5,2	250	71	2,4	47	
	III	240/157	198	53	107	5,65	1750	2854	4,2	247	72	1,6	31	
	IV	186/140	163	34	102	3,46	1403	3581	0,5	81	26	0,2	8	
13. S. 46 Jahre 859/53	I	250/140	195	86	82	7,07	1070	2230	2,6	249	71	1,1	35	100 50 Pervit. 1 Amp.
	II	260/150	205	78	84	6,55	1200	2500	1,6	246	65	1,0	29	
	III	207/137	172	54	94	5,07	1326	2750	2,1	274	64	0,8	41	
	IV	173/117	145	46	86	3,95	1226	2973	0,8	171	38	0,2	15	
	V	203/135	169	56	91	5,09	1248	2710	1,5	265	73	0,2	38	
14. F. 58 Jahre 865/53	I	240/130	185	106	71	7,54	917	1965	8,7	411	86	7,2	77	15
	II	240/130	185	95	73	6,95	1014	2130	15,1	427	99	7,4	80	
	III	183/113	148	75	77	5,77	1021	2077	19,1	374	87	4,1	55	
	IV	185/112	148	73	79	5,77	1085	2089	2,7	341	64	1,9	40	
15. Sch. 41 Jahre 863/53	I	270/160	215	78	86	6,70	1463	2570	5,6	392	125	1,1	75	50 Pervit. 1 Amp.
	II	260/160	210	63	98	6,15	1697	2740	9,3	355	122	1,3	73	
	III	140/105	122	36	86	3,09	1011	3240	2,1	147	48	0,3	20	
	IV	185/125	155	50	94	4,70	1253	2710	1,6	224	68	0,2	19	
	V	205/135	170	50	113	5,65	1526	2422	2,3	306	67	0,1	25	

Zeichenerklärung zur Tabelle: P = Periode (Dauer jeweils 20 min): p_s = systolischer Druck; p_d = diastolischer Druck in mm Hg; P_m = arterieller Mitteldruck in mm Hg; V_S = Schlagvolumen in Kubikzentimetern; V_M = Minutenvolumen in Litern; Fr = Pulsfrequenz pro Minute; E' = elastischer Widerstand in dyn/cm⁵; W = peripherer Widerstand in dyn x sec/cm⁵; Hv Harnvolumen in Kubikzentimetern pro Minute; C_p = renaler Plasmadurchstrom in Kubikzentimetern pro Minute; C_k = Glomerulusfiltrat in Kubikzentimetern pro Minute; C_{Cl} = Chloridclearance; C_U = Harnstoffclearance in Kubikzentimetern pro Minute.

Die ersten beiden Perioden sind jeweils Ruheperioden. Die 1. Injektion erfolgte am Wechsel von der II. zur III. Periode. Die eingetragenen Zahlenwerte für den Blutdruck, das Schlag- und Minutenvolumen, den elastischen und peripheren Widerstand sind Durchschnittsberechnungen aus 3—5 Messungen, von denen jeweils 2 Pulse ausgewertet wurden.

Reabsorption zurückzuführen. Entsprechend der gesteigerten Rückresorption kam es auch zu einer herabgesetzten Chlorid- und Harnstoffausscheidung. Die letztere war allerdings mehr von der jeweiligen Größe des Harnvolumens abhängig, als die der Chloride. Auffallenderweise zeigten alle Versuchspersonen mit hohem Blutdruck diese Veränderungen der Nierenfunktion in besonderem Maße, wobei auch die Höhe der Dosis eine wesentliche Rolle spielt.

Ebenso wie die hämodynamischen Veränderungen konnten auch die der Nierenfunktionen durch Pervitin beeinflusst werden (Fall 13 u. 15).

Bei Versuchsperson 13 erhöhte das Pervitin die Diurese, den Nierenplasmastrom und das Glomerulusfiltrat, dieses sogar bis zur Ausgangshöhe, ebenso die Harnstoffausscheidung, während die Chloridclearance sich nur wenig änderte. Bei Versuch Nr. 15 kam es ebenfalls zu einem Wiederanstieg der Nierendurchblutung und des Primärharns.

3. Über die Abhängigkeit der Nierenfunktionen von den Änderungen der Kreislaufdynamik: Der renale Plasmadurchstrom und das Herzminutenvolumen verhalten sich bei 13 Versuchspersonen gleichsinnig. Bei stärkerer Abnahme der Minutenvolumens sinkt auch die Nierendurchströmung ab. Bei geringen Änderungen des Minutenvolumens (Fall 1, 2, 4 u. 6) bleibt die Nierendurchströmung gleich. Ausnahmen sind Fall 3 und 11, bei denen einmal das Minutenvolumen gleich bleibt, die Nierendurchströmung aber absinkt und umgekehrt. Eine isolierte Reaktion der Nierengefäße auf das HMBR scheint demnach vorzukommen, aber nicht die Regel zu sein.

Eine auffallende Übereinstimmung war in unseren Fällen meist zwischen einer stärkeren Senkung des arteriellen Mitteldrucks und der Verminderung des Glomerulusfiltrats zu beobachten. Eine wesentliche Abnahme der Filtratmenge kam jedenfalls ohne eine entsprechende vorhergehende oder gleichzeitige Drucksenkung nicht zustande. Dabei spielte das Ausmaß der Druckabnahme eine Rolle. Bei einer Mitteldrucksenkung von 30% oder mehr reagierten unsere Versuchspersonen mit einem deutlichen Nachlassen der Filtration (Fall 8, 9, 10, 12, 13, 14 und 15). Außerdem ist auch eine gewisse individuelle Empfindlichkeit der Filtrationsleistung auf Mitteldruckänderungen feststellbar.

Bezeichnend hierfür war Versuch Nr. 8, der bei fast noch normalem Filtrat mit einer Verminderung desselben erst bei einer Senkung des Mitteldrucks von 35% reagierte. Die gleiche Versuchsperson (Fall 9) zeigte im Zustand kardialer Dekompensation, wobei der Ausgangswert des Filtrates beträchtlich herabgesetzt war, bereits auf eine Mitteldruckabnahme von 18% einen Rückgang der Filtratmenge. Bei Versuch Nr. 7 wurde ein ebenfalls kleines Ruhefiltrat schon bei einer Mitteldrucksenkung von 10% weiter verringert.

Die gleiche Abhängigkeit von den Schwankungen des Mitteldrucks gilt prinzipiell für die Wasser-, Chlorid- und Harnstoffabscheidung. Für die Verringerung der Harnabscheidung nach HMBR-Injektion ist also sicher die Abnahme des Filtrationsdruckes von Bedeutung. Sie war nämlich stets mit einem Kleinerwerden des Glomerulusfiltrats gekoppelt. Außerdem tritt durch die Abnahme des Filtrationsdruckes eine Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit des Primärharns in den Tubuli und dadurch eine Steigerung der Rückresorption ein. Diese läßt sich durch die Abnahme der Exkretionsindices für Wasser, Chloride und Harnstoff berechnen.

Die Durchblutung der Niere ist nur dann abhängig von den Änderungen des arteriellen Mitteldruckes, wenn der Widerstand in den Nieren-

gefäßen gleich bleibt, d. h. wenn keine aktive Regulation erfolgt. In unseren Fällen zeigte sich nach HMBR meist eine Zunahme des vasorenenalen Widerstands, da ähnlich wie im extrarenalen Kreislauf die Abnahme der Nierendurchblutung auf dem Höhepunkt der Wirkung prozentual stärker war als die arterielle Mitteldrucksenkung.

Da sich eine Abnahme der Nierendurchblutung in erster Linie dann auf den Filtrationsmechanismus im Glomerulus auswirkt, wenn es durch eine präglomeruläre Widerstandserhöhung zu einer Druckverminderung im Glomerulus kommt, ist es wahrscheinlich, daß in den Fällen, bei denen die Durchblutung und das Filtrat absanken, abgesehen von der extrarenalen Mitteldrucksenkung auch die Verengung des Vas afferens unter HMBR eine Rolle spielt. Ein gleichsinniges Verhalten der Nierendurchblutung und der Filtratmenge ist in 13 Fällen zu sehen. Eine Ausnahme bilden lediglich die Fälle 3 und 5.

Aus dem vorstehenden kann man folgendes entnehmen: Unter der HMBR-Wirkung verhält sich die renale Hämodynamik meist im wesentlichen nicht anders als der große Kreislauf. Es kommt hier wie dort zu einer Abnahme des Minutenvolumens oder aber zu keiner Veränderung. Die größte Einschränkung des Herzminutenvolumens und der Nierendurchblutung trat meist am Maximum der Drucksenkung auf. Da sowohl das Herzminutenvolumen als auch der renale Plasmastrom in dieser Phase prozentual stärker absinken als der arterielle Mitteldruck, ist eine Zunahme des renalen und des überwiegenden Teils des extrarenalen Gefäßwiderstandes zu erwarten. Für die Niere bedeutet dies neben der allgemeinen Drucksenkung noch einen weiteren Verlust an Filtrationsdruck durch die Konstriktion des Vas afferens. An der Verkleinerung der Harnmenge wirken sich sonach 3 Faktoren aus: 1. die Abnahme des arteriellen Mitteldrucks an sich, 2. die Verminderung des Ultrafiltrates, 3. die vermehrte Wasserrückresorption.

Während bei gesunden Versuchspersonen diese Reaktionen erst bei einer beträchtlichen Mitteldrucksenkung deutlich werden, genügte bei unseren Hochdruckpatienten eine prozentual schwächere Drucksenkung.

Diskussion.

Bisher wurden den C₆-Verbindungen bei gesunden und hochdruckkranken Versuchspersonen eine isolierte Vasokonstriktion an den Nierengefäßen zugeschrieben (MACKINNON, HAUGEN u. BLEGEN). Da wir jedoch sahen, daß der renale Plasmadurchstrom in der Regel nur in den Fällen absinkt, bei denen auch das Herzminutenvolumen kleiner wurde, glauben wir nicht, daß sich das vasorenale System unter der Einwirkung des Hexamethoniumbromids prinzipiell anders verhält, als der Großteil der übrigen Kreislauperipherie. Die Abnahme des Minutenvolumens, die

besonders bei hoher Ausgangslage zu sehen ist, dürfte auf einem verminderten Rückstrom zum Herzen infolge eines Tonusverlustes des venösen Kreislaufschenkels beruhen.

Dafür spräche vor allem die tierexperimentell (SCHIMMLER u. BLÖMER) und am Menschen festgestellte Abnahme des Venendrucks im Vorhof und die Tatsache, daß es beim Aufrichten aus der Horizontalen zu einem verstärkten Kollaps kommt (CHURCHILL u. DAVISON, RESTALL u. SMIRK). Die meisten Kollapsvorgänge sind aber mit einer Abnahme der zirkulierenden Blutmenge und des Minutenvolumens auf Grund einer Verminderung des Cava-Rückstroms verbunden (DUESBERG u. SCHROEDER). Teleologisch betrachtet könnte man in der Verminderung der Nierendurchblutung bei stärkerer Reduktion des Herzminutenvolumens unter der HMBR-Wirkung einen zweckgerichteten Vorgang annehmen, ähnlich wie ihn KREIENBERG u. Mitarb. bei O_2 -Mangelatmung sah. Vielleicht werden auch bei der Herzinsuffizienz die Nierengefäße enger gestellt (BLEGEN u. AAS, FISHMAN, MAXWELL, CROWDER u. MORALES, DAVIES u. KILPATRICK), um die darniederliegende O_2 -Versorgung der Gewebe nicht noch weiter zu beeinträchtigen. Andererseits kann das HMBR sicherlich, wenn auch nur selten, zu einer isolierten vasorenenalen Durchblutungsabnahme führen, ohne daß die übrige Gefäßperipherie daran beteiligt ist.

Zur Erklärung der Einschränkung der Filtration und Diurese ist, wie wir gesehen haben, eine Mitteldrucksenkung in unseren Fällen durchaus annehmbar. MORTIMER u. Mitarb. stellten an Hunden eine deutliche Abnahme des Filtrates unter der HMBR-Wirkung fest, wenn der arterielle Mitteldruck unter 60–70 mm Hg absank. Von da ab verliefen Mitteldrucksenkung und Filtratverminderung weitgehend parallel. Bei unseren Versuchspersonen muß es naturgemäß, da die Nierenfunktionen zumeist pathologisch verändert waren, schon bei einem wesentlich höheren Mitteldruckniveau zu einer Reduzierung des Filtrats kommen. Daß auch eine Mitteldrucksenkung allein ohne Veränderung der Filtratmenge und der Durchströmung zu einer Abnahme der Diurese führen kann, ist neuerdings von SELKURT beschrieben worden. Häufig findet man dabei auch eine Verminderung der Kochsalzausscheidung. Aber auch nach Einengung der Aorta thorakalis kann, wenn stromabwärts der Druck bis auf etwa 70 mm Hg abnimmt, ein weitgehend ähnlicher Effekt wie unter der HMBR-Wirkung erreicht werden. Die Nierendurchblutung und das Filtrat nehmen dabei nämlich ab, noch stärker aber wird die Diurese und vorallem die Kochsalzausscheidung gehemmt (PITTS, DUGGAN u. MINER).

Nach diesen Ergebnissen gewinnt man den Eindruck, daß die Ganglienblockade durch die C_6 -Verbindungen wahrscheinlich nicht auf den Bereich der nervösen Versorgung der Niere übergreift. Man kann dies außerdem aus Untersuchungen schließen, die an der entnervten gesunden und an der Hochdruckniere das Verhalten der Nierenfunktion prüften, da sich dabei zumindest in der ersten Phase ein andersartiges Verhalten als unter Hexamethonium zeigt. Der Harn der entnervten Niere ist an Menge vermehrt und verdünnt, d. h. es wird mehr Wasser ausgeschieden (ELLINGER, REIN u. JEIKSON). Das haben wir aber nie beobachten können, auch dann nicht, wenn der Mitteldruck, die Durchblutung und das Filtrat unverändert blieben (Fall 1, 2, 4 u. 6). Eine Ganglienblockade der Nieren müßte aber nach den pharmakologischen Untersuchungen an der prä- und postganglionären Faser wenigstens theoretisch einer temporären Entnervung gleichkommen.

Gegen eine spezifische Wirkung der C₆-Verbindungen auf die Nierenfunktion sprechen weiterhin Versuche mit ganz anders gearteten Stoffen, die aber eine dem HMBR sehr ähnliche Wirkung aufweisen. So führt z. B. auch das Protoveratrin zu einer Senkung des arteriellen Mitteldruckes durch einen Abfall des Minutenvolumens (MYERS, FRIEDLICH, SCANNEL, HUEBER) und zu einer Reduzierung des renalen Plasmastroms, des Glomerulusfiltrates und der Diurese (HUEBER, HOOBLER u. CORLEY, MEILMAN). Das Protoveratrin ist jedoch eine spezifisch vagusreizende Substanz — dies kommt in einer oft enormen Verlangsamung der Herzschlagfolge zum Ausdruck — und sie bringt außerdem auch die als BEZOLD-JARISCH-Effekt bezeichneten Kreislaufreflexe in Gang. Nach den Untersuchungen von SCHIMERT und ZICKGRAF und anderen Autoren bewirken die dihydrierten Mutterkornalkaloide im akuten Versuch eine Drucksenkung ebenfalls über eine Abnahme des Minutenvolumens und nach REUBI und eigenen Versuchen auch einen Abfall der Nierendurchblutung und des Filtrates. Lediglich das Hydrazinophthalazin und seine Derivate zeigen nach den Untersuchungen von BEIN u. Mitarb. eine Steigerung der peripheren Durchströmung bei konstantem rechten Vorhofdruck, so daß man daraus auf eine Zunahme des Minutenvolumens trotz des Druckabfalles schließen kann. Diese Substanz löst nach REUBI eine renale Hyperämie aus. Kürzlich berichteten jedoch KUMMER und LA ROSÉE, die eine größere Reihe von Versuchspersonen mit Hypertonie untersucht haben, auch bei diesem Stoff über eine Minutenvolumensenkung und über einen Abfall der Nierendurchströmung und des Filtrates.

Obwohl unter physiologischen Verhältnissen Änderungen des Minutenvolumens und des arteriellen Mitteldrucks kaum zu einem gleichsinnigen Verhalten der Nierenfunktionen führen, kann dies demnach unter der Wirkung vasoaktiver Stoffe der Fall sein.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung des Hexamethoniumbromids (HMBR) auf die arterielle Kreislaufdynamik mit der Methode der sphygmographischen Minutenvolumenbestimmung und auf die Nierenfunktionen mit der Paraaminohippursäure-, Kreatinin-, Chlorid- und Harnstoffclearance bei 15 Versuchspersonen (mit Hypertonie und Nephrosklerose) untersucht.

Dabei zeigte sich ein weitgehend gleichsinniges Verhalten des Herzminutenvolumens und des Nierenplasmadurchstroms. Die Abnahme der Filtratmenge, der Wasser-, Chlorid- und Harnstoffausscheidung läßt sich in der Regel allein durch die Veränderungen des arteriellen Mitteldrucks erklären. Ein selektiver Angriffspunkt des HMBR an den Nieren ist in unseren Versuchen nicht nachweisbar.

Literatur.

- BEIN, H., F. GROSS, J. TRIPOD u. R. MEIER: Schweiz. med. Wschr. **83**, 14 (1953). — BLAINLEY, I. D.: Lancet **1**, 993 (1952). — BLEGEN, E. M., u. K. AAS: Acta med. scand. (Stockh.) **138**, 391 (1950). — BROEMSER PH., u. O. F. RANKE: Z. Biol. **90**, 467 (1930). — BROWN and FELDBERG: J. of Physiol. **86**, 10 P (1936). — BURN, I. H., and H. H. DALE: J. of Pharmacol. **6**, 417 (1915). — CHURCHILL and DAVISON: Lancet **2**, 803 (1951). — DAVIES, C. E., and KILPATRICK: Clin. Sci. **10**, 53 (1951). — DUESBERG, R., u. W. SCHROEDER: Pathophysiologie und Klinik der Kollaps-

zustände. — ELLINGER, PH.: Handb. der norm. u. pathol. Physiol. Bd. 4. Berlin 1930. — FISHMAN, A. P., M. H. MAXWELL, H. CROWDER and P. MORALES: Circulation **3**, 703 (1951). — HAUGEN, H. N., and E. M. BLEGEN: Scand. J. of Clin. Labor. Invest. Fol. 5; Nr. 1, 58 (1953). — HOOBLER, S. W., and R. W. CORLEY: Med. Bull. **16**, 362 (1950). — HUEBER, E.: Wien. klin. Wschr. **65**, 248 (1953). — JEIKSON, J. A.: Ter. Arch. (russ.) **22**, 35 (1951). — KEWITZ, H., u. H. REINERT: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **218**, 119 (1953). — KREIENBERG, W., L. PROKOP u. TH. SCHIFFER: Pflügers Arch. **251**, 675 (1949). — KUMMER, P., u. R. v. LA ROSÉE: Münch. med. Wschr. **95**, 729 (1953). — MACKINNEN, J.: Lancet **2**, 12 (1952). — MEILMAN, E.: J. Clin. Invest. **32**, 80 (1953); **31**, 649 (1942). — MORTIMER: J. of Physiol. Vol. 172 **1953**. — MYERS, G. S., A. L. FRIEDLICH u. J. G. SCANNEL u. M.: Proc. New England, Cardiovasc. Soc. **4**, 1950. — PATON, W. M. D., and M. PERRY: J. of Physiol. Proc. July **41**—15, 1950. — PATON, W. M. B., and E. J. ZAIMIS: Brit. J. Pharmacol. **6**, 155 (1951). — PITTS, R. F., J. J. DUGGAN and PH. MINER: J. Clin. Invest. **29**, 372 (1950). — POPPER u. MANDEL: Erg. inn. Med. **53**, 685 (1937). — Z. Biochem. **291**, 354 (1937). — REIN, H.: Einführung in die Physiologie des Menschen. Berlin: Springer 1940. — RESTALL, A. A., and F. H. SMIRK: Brit. Heart. J. **14**, 1 (1952). — REUBI, F.: Helvet. med. Acta (A) **17**, 26 (1950). — SCHIMERT, G., u. H. ZICKGRAF: Klin. Wschr. **1949**, 3/4. — SCHIMMLER, W., u. H. BLÖMER: nicht veröffentl. Ergebnisse. — SCHIMMLER, W., u. ZIMMERMANN: in Vorbereitung. — SELKURT, E. E.: Circulation **4**, 541 (1951). — VAN SIYKE u. Mitarb.: J. Clin. Invest. **6**, 458 (1929). — SMITH, W., N. FINKELSTEIN u. Mitarb.: J. Clin. Invest. **24**, 388 (1945). — WEZLER, K., u. A. BÖGER: Erg. Physiol. **1939**, 41. — ZICKGRAF, H.: Z. klin. Med. **1949**.

Dr. med. W. SCHIMMLER, II. Med. Klinik der Universität München.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. HÄUSLER).

Über schraubenförmige Struktur von Arterien.

III. Mitteilung.

Pharmakologische Strukturanalyse von Herzkranzgefäßen.

Von

H. F. HÄUSLER und R. G. FILIPPI.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. August 1953.)

Schon histologische Untersuchungen der Coronararterien streichen die Besonderheiten der Struktur ihres Wandbaues heraus: BENNINGHOFF (1930) zählte sie den Arterien des muskulären Typus zu und stellte fest, daß in den kleinen Ästen die Muskulatur schraubenförmig angeordnet sein kann. Nach EDHOLM (1912) unterscheiden sie sich von allen anderen Arterien durch eine starke Schicht von Längsmuskeln, nachdem bereits WIESEL (1907) das Überwiegen longitudinaler Muskelfasern betont hatte. Aus Schnitten der Papillarmuskel-Arterien schloß WOLFF (1930) auf einen Muskelverlauf in Schraubentouren mit flacheren oder steileren Winkeln. ZIMMERMANN (1923) wies an den Arteriolen des Herzens schraubenförmig verlaufende Muskelfasern nach. Einen Unterschied in der Anordnung der Muskulatur einzelner Gefäßabschnitte der Coronarien zeigte WOLKOFF (1923), wonach Hauptstamm und kleine Äste vorwiegend Längsfasern, die Äste mittleren Kalibers mehr zirkulär verlaufende Fasern enthalten.

Die besondere Rolle steiler Schraubentouren wurde auch in anderem Zusammenhang erörtert: Am Beispiel der aus der Arteria coronaria sin. abgehenden Aa. cardiaortales, die ausschließlich steilschraubig und längs angeordnete Muskulatur besitzen, stellten NEUMANN (1939) und KÖCHER (1941) fest, daß sich diese Muskulatur überall dort entwickelt, wo Arterien stärkster Beanspruchung in axialer Richtung ausgesetzt sind. RATZENHOFER (1951 und 1952) bringt die Bildung von Längsmuskulatur ebenfalls mit der Einwirkung von Zugkräften in Zusammenhang; er zeigte, daß Zugspannungen, wie sie an der Oberfläche expansiv wachsender Tumorknoten der Schilddrüse und des Myometriums auftreten, eine krankhafte, zur Gefäßverödung führende Neubildung von Längsmuskulatur hervorrufen.

Damit erhob sich die Frage, ob die pharmakodynamisch feststellbaren Gefäßwandreaktionen dem morphologischen Bild entsprechen und als der funktionelle Ausdruck gerade dieser besonderen strukturellen Gegebenheiten anzusehen sind. Denn erst wenn man auf Grund der Kontraktion einzelner Faserzüge zu einer dem histologischen Bild entsprechenden Anordnung der Muskulatur käme, ließen sich Schlüsse über die funktionelle Bedeutung dieser Struktur und die Möglichkeit einer Abhängigkeit der Wirkung gefäßaktiver Pharmaka vom Wandbau ableiten. Zur Bearbeitung dieser Frage schien wiederum die Methode besonders geeignet, die HÄUSLER (1933) in Versuchen an Mesenterialgefäßen entwickelt sowie

bereits zu Untersuchungen an Coronarien herangezogen hatte und mit deren Ergebnissen sich die damals bekannten und inzwischen hinzugekommenen histologischen Befunde ebenso in Einklang bringen ließen, wie dies in der vorangehenden Mitteilung PICHLER, LAZARINI u. FILIPPI (1953) durch pharmakologische Analyse der Struktur von Hirnarterien nachweisen konnten:

Aus dem Vergleich der Reaktionen intakter und aufgeschnittener Gefäßstücke, in Kettenform aneinandergereihter Arterienringe und unter verschiedenen Winkelgraden geschnittener Gefäßstreifen gegenüber der quantitativ-relativen Wirkung von Adrenalin (erschlassend) und Histamin (kontrahierend) wurde auf Vorherrschen und Verlauf der Fasern geschlossen. Im besonderen waren für die Beurteilung der Gefäßstruktur folgende Kriterien maßgebend:

1. Erschlaffung bzw. Kontraktion *aller drei* typischen Suspensionen (Ringstreifen bzw. -kette, 45°-Schraube, Längsstreifen bzw. intaktes Gefäßstück) beweist das Vorhandensein von Muskelfasern in allen Richtungen (Ring-, Schrauben-, Längsmuskulatur): Schraubentyp.

2. Erschlaffen bzw. kontrahieren sich die Ringe und die 45°-Schrauben, während die Längsstücke bzw. der 90°-Streifen keinen oder sogar inversen Effekt zeigen, so muß das für das Überwiegen von Ring- bzw. flacher Schraubenmuskulatur sprechen.

So konnten PICHLER, LAZARINI u. FILIPPI (1953) an den Kopfarterien des Menschen und des Rindes mehrere funktionell wichtige Bautypen aufzeigen und folgende physiologisch wie pathologisch bedeutsame Unterschiede zwischen den Gefäßen des Menschen und des Rindes nachweisen: Die Gefäßgebiete der Carotis externa und interna stellen beim Rind zwei bis in die kleinsten untersuchten Aufzweigungen von 0,4 mm Durchmesser strukturell völlig verschiedene Arteriensysteme dar. Beim Menschen hingegen entsprechen die den Hirnschädel versorgenden Äste der Arteria carotis externa dem Strukturtyp der intrakraniellen Gefäße, nämlich der steilen Schraubenspirale. Bei den Hirnarterien waren Unterschiede zwischen Rind und Mensch schon durch die in bezug auf den Kreislauf verschiedene statische Lage des Gehirns verständlich. Überdies wurde für den Bautyp der Schraubenspirale gezeigt, daß ein Kontraktionsmittel bei gleichzeitiger Verkürzung eine Gefäßerweiterung bewirken kann. Bezüglich der Coronarien hat in ähnlicher Überlegung DUANČIČ (1942) den Versuch einer mechanischen Deutung der inversen Sympathicuswirkung gemacht, indem er, gestützt auf histologische Befunde einer steilschraubig verflochtenen und longitudinalen Gefäßmuskulatur, die Vorstellung entwickelt, daß deren Kontraktion zu einer Lumenerweiterung führe und vice versa.

Im Hinblick auf die vergleichbaren funktionellen Voraussetzungen für die Coronarien des Rindes und des Menschen erscheint eine Übertragung von an Rinder coronarien gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen vertretbar, zumal histologische Befunde für eine weitgehende Ähnlichkeit sprechen (DUANČIČ, 1942). Bei den zahlreichen, immer wieder unternommenen Versuchen an menschlichen Coronarien zeigten sich freilich die (frühestens 8 Std post mortem entnommenen) Gefäße leider als zu wenig reaktionsfähig; deshalb seien im folgenden nur die Versuche an Rinder coronarien besprochen, an welchen außer den hauptsächlich zur Strukturanalyse verwendeten Routinetestmitteln *Adrenalin* und *Histamin* noch eine Reihe von anderen Pharmaka und Maßnahmen zur Prüfung kamen.

Methodik.

Die Coronarien wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen, präpariert und in O_2 -gesättigter Tyrode bei $4^\circ C$ aufbewahrt. Nach ELLENBERGER u. BAUM (1941) besitzt die Arteria coronaria sin. des Rindes etwa den doppelten Durchmesser der dextra und versorgt mehr als zwei Drittel des Herzens. Sie teilt sich nach längerem Verlauf im Sulcus coronarius in den Ramus circumflexus und descendens, während die Arteria coronaria dextra bald nach ihrem Hervortreten in mehrere dünne Äste zerfällt. Die zum Vergleich herangezogenen Mesenterialarterien waren Äste der Arteria mesenterica cranialis.

Im allgemeinen genügte zur Strukturanalyse ein Vergleich des Verhaltens von 3 in Winkeln von 0° (— Ringe), 45° und 90° (= Längsstreifen) zum Querschnitt verlaufenden Gefäßpräparaten. Dementsprechend geben im folgenden die „Grade“ den Winkel an, unter dem die Schnittführung gegen den Gefäßquerschnitt erfolgte. Wurden Ringketten neben Streifen verwendet, so wurde die Länge der Streifen so bemessen, daß die Summe des halben Umfanges der einzelnen Ringe der Länge der Streifen entsprach. Das 50 ml Bade Flüssigkeit enthaltende Versuchsgefäß wurde normalerweise mit Sauerstoff, bei einem Teil der Versuche mit Stickstoff durchperlt. Beim Auswaschen wurde Tyrode von gleicher Temperatur, die ebenfalls durch vorheriges Durchströmen sauerstoffgesättigt war, verwendet. Hinsichtlich weiterer Einzelheiten sei auf HÄUSLER (1933) und PICHLER, LAZARINI u. FILIPPI (1953) verwiesen.

Ergebnisse.

1. Strukturanalyse.

a) *Arteria coronaria sin.*: Bei Untersuchung der einzelnen Abschnitte mit Adrenalin bzw. Histamin vom Ursprung der Arterie bis zu einem Durchmesser von etwa 0,5 mm zeigte sich folgendes: Im Hauptstamm überwiegen steile Schraubentouren (Abb. 1), die 45° und 90° -Streifen sind zumeist die kräftigsten. Im Ramus descendens und circumflexus tritt bis zu einem Durchmesser von 2 mm der steile Faserlauf zugunsten ringförmiger und flachschräubiger Muskelfaseranordnungen zurück (Abb. 2); hier findet sich stellenweise fast reine Ringmuskulatur, die aber in den kleineren Verzweigungen von etwa 1 mm Durchmesser wiederum in vorwiegende Schraubenstruktur übergeht (Abb. 3).

b) *Arteria coronaria dextra*: Ihre Abschnitte sind nicht so deutlich gegliedert, doch zeigt sich im mittleren Teil bei einem Durchmesser von etwa 2 mm ein Überwiegen der Ringmuskulatur.

Beiden Gefäßen ist das Überwiegen der längs- und schraubenförmig angeordneten Muskulatur im Hauptstamm, d. h. bis zu einem Durchmesser von 6 bzw. 3 mm gemeinsam. In dem folgenden Bereich tritt die Ringmuskulatur hervor und in kleineren Gefäßen dominieren wieder

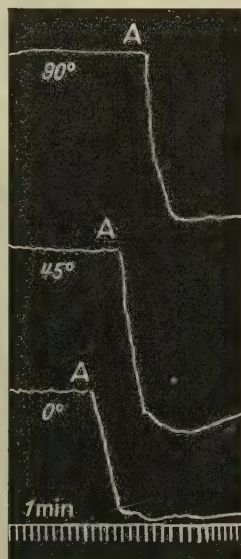


Abb. 1. A. coronaria sin. (Hauptstamm) $\varnothing$ 9 mm: Schraubenstruktur. Bei A: Zusatz von Adrenalin ($1 \mu g/ml$),

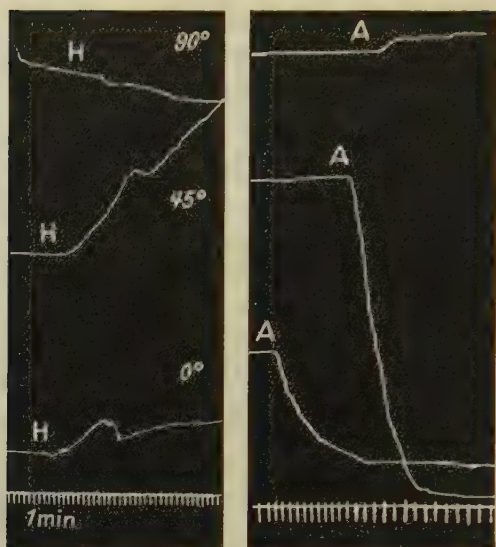


Abb. 2. A. coronaria sin. (Ramus descendens) $\varnothing$ 3 mm: Ringstruktur. Bei H: Zusatz von Histamin (10 μ g/ml), bei A: Zusatz von Adrenalin (10 μ g/ml).

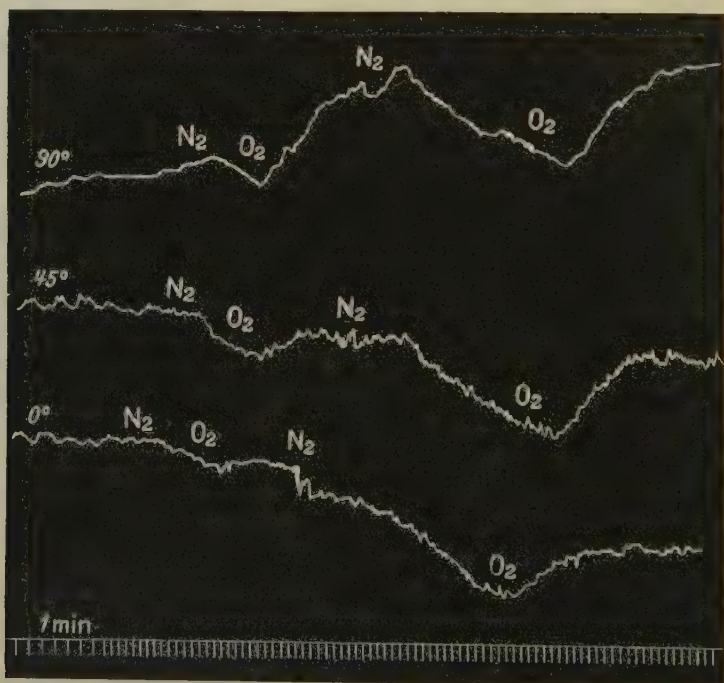


Abb. 3. A. coronaria sin. (Ramus descendens) $\varnothing$ 1 mm: Schraubenstruktur. Be N₂: Ersatz der Badeflüssigkeit durch stickstoffgesättigte Tyrode, bei O₂: sauerstoffgesättigte Tyrode.

Schraubentouren. Innerhalb dieser Einteilung bestehen selbstverständlich fließende Übergänge. Ferner wurden rechts- und linksgängige Schrauben unter verschiedenen Winkeln geprüft, wobei sich jedoch kein Unterschied ergab, so daß auf eine scherenförmige Verflechtung der Muskelemente geschlossen werden muß. Auffallend war, daß sich die relativ wandstarken, aortennahen Teile bis zu einem Durchmesser von etwa 6 mm viel muskelschwächer erwiesen als die dünnwandigen peripheren Äste von einem Durchmesser von 3 mm abwärts. Das Diagramm Abb. 4 soll diese Verhältnisse zusammenfassend darstellen.

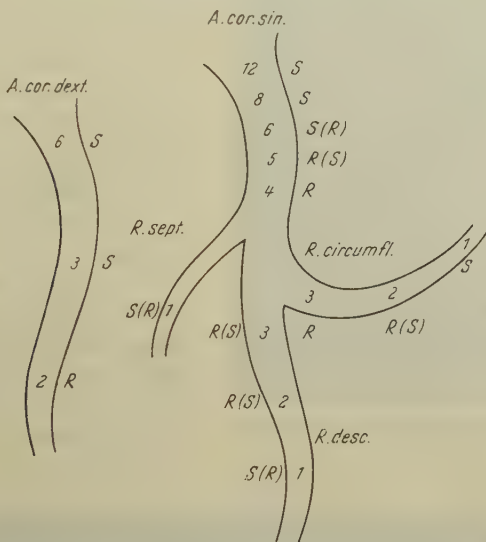


Abb. 4. Diagramm der Muskelstruktur der Coronarien des Rindes: *S* überwiegende Schraubenstruktur, *R* überwiegende Ringstruktur.

2. Spontanrhythmik und besonderes Verhalten.

Bei der Entnahme aus dem frisch geschlachteten Rind erscheinen die Coronarien stets dilatiert und schlaff, während die Körperarterien verengt sind, was schon PARK (1912) aufgefallen ist. Im Bade erfolgte nun im Gegensatz zu allen bisher untersuchten, nämlich den Mesenterialarterien (HÄUSLER, 1933) und den Kopfgefäßen (PICHLER, LAZARINI u. FILIPPI, 1953), kein Aushängen, sondern eine langsame Tonuszunahme, die mit der Sauerstoffsättigung nichts zu tun hat und auf Auswaschen vorübergehend nachläßt. Früher oder später setzte in etwa der Hälfte der Versuche eine mehr oder minder lebhaftere Spontanrhythmik ein, wobei die muskelaktivsten Gefäßstücke auch die stärkste Rhythmik zeigten. Die Kontraktion der Gefäße erfolgt meist rascher als die Erschlaffung, der Tonus nimmt stetig zu und die Rhythmik kommt erst nach Stunden

zu einem Stillstand in maximaler Kontraktion (Abb. 5). Präparate mit lebhafter Rhythmik reagieren auch auf pharmakologische Einwirkungen sehr empfindlich. Die Rhythmik kann beschleunigt ausgelöst werden durch *Histamin*, *Ergotamin*, $BaCl_2$ und *Sauerstoffdurchströmung*, sie wird unterdrückt durch *Adrenalin*, *Noradrenalin* und *Stickstoffzufuhr*.

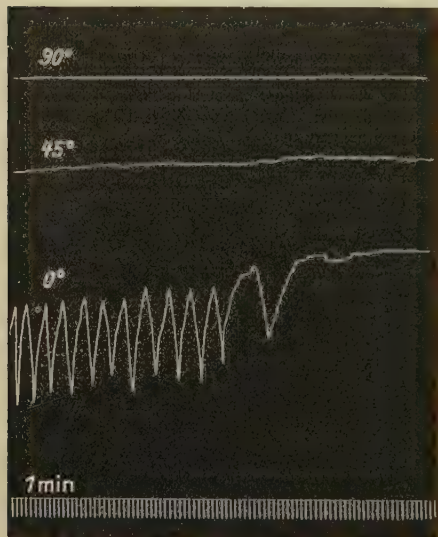


Abb. 5. *A. coroniasin.* (Ramus descendens) $\varnothing$ 2 mm: Spontanrhythmik.

Bemerkenswerterweise wiesen Streifen von arteriellen Aufzweigungen oder Abgängen besonders lebhafte Rhythmik des großen Gefäßes auf, wofür ein Beispiel aus dem Mesenterialgebiet gegeben sei (Abb. 6). Gleichzeitig zeigt diese Abbildung, welche Verhältnisse an den Abgangsstellen vorzufinden sind: In der in dieser Abbildung enthaltenen Zeichnung ist abgeleitet, daß auch, wenn Hauptstamm und Seitenast ringförmige Struktur zeigen, an der Abgangsstelle selbst schraubenförmige Struktur

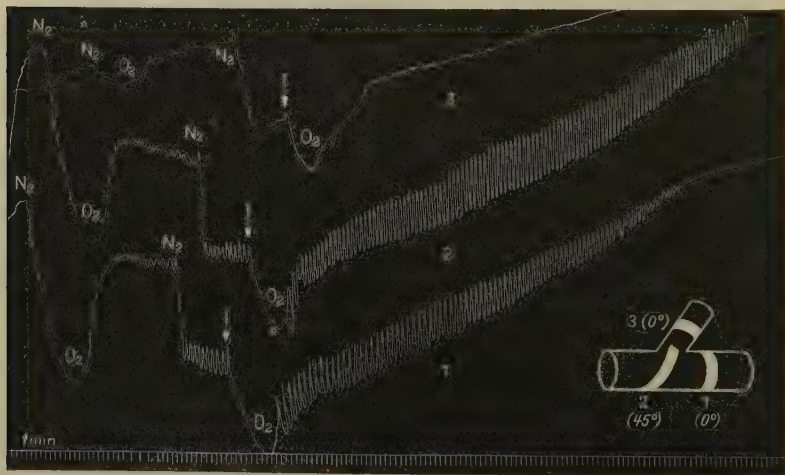


Abb. 6. Abzweigungsstelle von einer Mesenterialarterie (Hauptstamm 1 und 2: $\varnothing$ 3 mm, Nebenast 3: $\varnothing$ 1,5 mm). Bei N_2 : Ersatz der Badeflüssigkeit durch stickstoffgesättigte Tyrode, bei O_2 : durch sauerstoffgesättigte Tyrode, bei $\downarrow$ Auswaschung.

besteht, was daraus hervorgeht, daß das schraubenförmig geschnittene Stück in gleicher Weise reagiert wie das Ringstück des Hauptstammes und des abgehenden Seitenastes.

3. Pharmakologisches Verhalten.

Die Ergebnisse mit verschiedenen Pharmaka sind in Tab. I zusammengefaßt. *Adrenalin* und *Noradrenalin* wirken auf die Coronarien gleich stark erweiternd, während die Mesenterialäste sich auf *Noradrenalin* etwas stärker verengen als auf *Adrenalin*. *Ergotamin* zeigte in der Konzentration von 10 µg/ml keine Wirkung, schwächte aber, vor *Adrenalin*

Tabelle 1.

Substanz	Konzentration in µg/ml	Wirkung ¹ auf	
		Coronarien	Mesenterial- arterien
Noradrenalin	0,1	— — —	++
Adrenalin	0,1	— — —	+
Adrenalin nach vorherigem Ergotamin (10,0 µg/ml)	0,1	0	—
Ergotamin	10,0	0	0
Histamin	1,0	+	+++
Histamin nach vorherigem Neo-Antergan (0,1 µg/ml)	1,0	0	0
Neo-Antergan „La Specia-Paris“	0,1	0	0
(N-α-Pyridyl-p-Methoxybenzyl-N'- Dimethyl-Äthylendiamin)			
k-Strophanthin	1,0	(+)	++
Digitoxin	10,0	0	
Scillaren „Sandoz-Nürnberg“	1,0	0	(—)
Khellin	10,0	— — —	
Neokellin „Interchemie-Wien“	100,0	—	
(4,6-Dioxyumaronon)			
Hypophysenhinterlappen			
Pituisan „Sanabo-Wien“	1—10 I.E.	0	
Pituin „Rieswerke-Graz“	4 I.E.	0	+++
Papaverin	10,0	— — —	— — —
Theophyllin	1,0	— —	
Theobromin	10,0	—	
Coffein.-Natr. benzoic.	100,0	— —	— —
Procaïn (Novocain)	10,0	0	
Äthanol	0,2—0,5%	0	
Amylium nitrosum	1,0	— — —	
Natrium lacticum	100,0	—	
BaCl ₂	1,0	+++	+++
KCl	400,0	— —	
	800,0	++	
Sauerstoffsättigung		+++	+
Stickstoffsättigung		— — —	—

¹ Zeichenerklärungen: Kontraktion —, — —, — — —; keine Wirkung 0; Erschlaffung —, — —, — — —.

gegeben, an den Coronarien die Erschlaffung ab, während bei den Mesenterialarterien die Kontraktion völlig aufgehoben wird, ja sogar die „Umkehr“ nachzuweisen ist (HÄUSLER, 1933). Der durch *Histamin* oft lange erhöhte Tonus kann durch Zugabe von *Neo-Adtergan*, welches selbst aber keinen Effekt hat, sofort gesenkt werden. Von den geprüften Herzglykosiden hatte *k-Strophanthin* eine Kontraktion zur Folge, die anderen waren nicht immer sicher wirksam, vor allem konnte in keinem der Versuche eine deutliche Erschlaffung beobachtet werden. Erschlaffend wirkten, in der ungefähren Reihenfolge der Konzentration ihrer Wirksamkeit genannt: *Papaverin* > *Amylnitrit* > *Khellin* > *Theophyllin* > *Theobromin* > *Coffein* > *Natr. lact.* > *Neokellin*; *Procain* und *Äthanol* hatten in den verwendeten Dosen überhaupt keine Wirkung. Von den untersuchten Ionen zeigte $BaCl_2$ Verengung, KCl zuerst Erschlaffung, dann ebenfalls einen kontrahierenden Effekt. *Hypophysenhinterlappen-Extrakt* verengte nur an den Mesenterialgefäßen; wie die Verhältnisse bei kleineren Gefäßen liegen, konnte mit unserer Methode, die nur bis zu einem Durchmesser von etwa 0,5 mm anwendbar ist, bisher nicht untersucht werden.

Des weiteren wurde das Verhalten der Coronarien und Mesenterialarterien bei O_2 - bzw. N_2 -Sättigung untersucht. Unter Sauerstoff kam es immer zu einer langsamen, stetigen Tonzunahme und zum Auftreten von Spontanrhythmen. Wurde nach Verwendung von stickstoffdurchperlter Tyrode, wobei es zu einer Erschlaffung kam, die Lösung gegen O_2 -gesättigte ausgewechselt, so kam es an den Coronarien zu einer prompten Tonzunahme, während die Mesenterialarterien nur träge reagierten. Stickstoff wirkte hingegen immer erschlaffend und unterdrückte eine vorhandene Spontanrhythmik. Auch hier erwiesen sich die Coronarien empfindlicher als die Mesenterialarterien und erschlafften auf plötzlichem Fehlen von Sauerstoff, i. e. Zufuhr stickstoffgesättigter Tyrode, sofort und nachhaltig. ALELLA (1953) fand bei Coronar-Durchblutungsmessung mittels Thermoströmuhr ein ebensolches Verhalten.

Besprechung der Ergebnisse.

Mittels der vorliegenden pharmakologischen Strukturanalyse konnte gezeigt werden, daß die histologisch beschriebenen strukturellen Besonderheiten mit dem Vorherrschen bestimmter Faserzüge übereinstimmen. Wenn damit nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell zuerst ein Abschnitt mit vorwiegend steiler Schrauben-, dann Ring- und schließlich wieder steiler Schraubenstruktur unterschieden werden konnte, so erhebt sich die Frage nach der besonderen Bedeutung dieser Verhältnisse: Die Bedeutung der Faserzüge in den größeren und damit für die angewandte Methode noch zugänglichen Gefäßabschnitten liegt offenbar nicht in erster Linie in der Strombahnerweiterung oder

Verengung, die doch wohl vorwiegend den kleinen und kleinsten Gefäßen vorbehalten ist. Vielmehr könnte die Bedeutung besonderer Faseranordnungen in der Einstellung des Gefäßes auf Verschiebungen des umliegenden Gewebes liegen, die das Gefäß zwangsläufig mitmacht, ohne daß es dabei seine Weite wesentlich verändern muß. Nun liegen gerade bei den Coronarien, die doch ständig den Exkursionen des Herzmuskels folgen müssen, besondere Verhältnisse vor, die eine entsprechende Anpassung der Gefäße verlangen: Vor allem der erste Abschnitt der Coronarien wird noch den ständigen Druckschwankungen in der Aorta, aber auch den Kontraktionen der Vorhöfe, die sich gegen die Ebene des Sulcus coronarius bewegen, und den damit verbundenen Beanspruchungen auf Zug ausgesetzt sein. Auch die kleinen Gefäße, die in Richtung Herzspitze ziehen, sind bei jeder Diastole auf Zug beansprucht. Hingegen kann man bei Gefäßen im Bereich des Sulcus coronarius von einer so einschneidenden Mitbeteiligung absehen. In diesem Sinne sind auch die erhobenen Befunde zu deuten, nämlich daß gerade die Gefäße mittleren Durchmessers, die in der Höhe der Vorhofkammergrenze bzw. Ventilebene liegen, vorwiegend ringförmig strukturiert sind. Dies läßt darauf schließen, daß auch hier, gleichwie es RATZENHOFER (1951 und 1952) für die Gefäße in Myomen und Schilddrüsentumoren annimmt, die Kräfte der Längszerrung für diese Ausbildung verantwortlich sein dürften. Offensichtlich ist eine starke Längsmuskulatur, z. B. an den schon genannten Aa. cardiaortales, am besten geeignet, den Kräften axialer Beanspruchung derart Genüge zu leisten, daß unter ihrer Einwirkung keine wesentliche Verengung des Lumens eintritt. An den parallel zur Herzachse, ferne von der Ventilebene ziehenden Coronararterien kommt zu der Längszerrung im Moment der Diastole noch die Stauchung während der Systole hinzu. Unter dem Einfluß solcher Kräfte wäre ein nur mit Längsmuskulatur begabtes Gefäß einer übermäßigen druckpassiven Erweiterung preisgegeben. Hier wäre eine starke Ring- oder flache Schraubenmuskulatur am geeignetsten, um unerwünschter Lumenerweiterung vorzubeugen. Die an Coronarien auf funktionellem Wege gefundene Wandstruktur der steilen Muskelschraube kann demnach als Kompromißlösung angesehen werden, Stauchungs- und Dehnungskräften optimal entgegenzuwirken und dabei wesentliche Änderungen des Lumens zu vermeiden.

Weiters darf noch hinzugefügt werden, daß der steilschraubigen Wandstruktur auch insofern noch eine Bedeutung zukommen mag, als sie bei einer Verkürzung der Längsfasern nicht nur zu keiner Verengung des Lumens, sondern in manchen Fällen, wie das PICHLER, LAZARINI u. FILIPPI (1953) an Teilgebieten von Hirnarterien zeigen konnten, sogar zu einer Erweiterung Anlaß geben kann, und zwar zu einer um so stärkeren, je steiler die Muskelschraube verläuft, was für das steilschraubig gebaute Gefäß noch einen besonderen Schutzfaktor bedeuten würde.

Bei einem Teil der Versuche trat eine oft sehr regelmäßige und über Stunden anhaltende Spontanrhythmik auf, die unter Tonuszunahme langsam ausklang und, wie erwähnt, vor allem durch O_2 -Sättigung bzw. -Mangel zu beeinflussen war. Eine derartig deutliche Rhythmik ist an Coronarien bisher nur von ROTHLIN (1920) beschrieben worden. Auch in unseren Versuchen konnten keine Anhaltspunkte darüber gewonnen werden, welcher Herkunft sie sein könnte. Manchmal war es möglich, die rhythmischen Bewegungen allein durch O_2 -Zufuhr auszulösen. Da für die Gefäßwand der Aorta ein neuraler Plexus in Analogie zur Darmwand bekannt ist, könnte es sich hierbei um Entladungen intramuraler nervöser Elemente handeln. Sie könnten wohl auch auf Stoffwechselveränderungen bezogen werden, die langsam immer wieder zwischen zwei extremen Zuständen ausreguliert werden. ROTHLIN (1920) hat bekanntlich auf eine phylogenetische Erklärungsmöglichkeit hingewiesen, indem diese rhythmische Tätigkeit der Gefäßmuskulatur gleichsam als spezifische Eigenheit glattmuskeliger Organe und Restzustand einer früheren Bedeutung als peripheres Herz anzusehen sei.

Die Überprüfung einer Reihe von Pharmaka in ihrer Wirkung auf Coronarstreifen und -ringe zeigte, wie an Hand der Tabelle zu ersehen ist, daß fast durchwegs Dosen angewandt werden mußten, die im intakten Organismus kaum einmal an die Coronarien herankommen dürften. Es muß daher trotz des großen Vorteils, den die angewandte Methode zur Aufklärung der „funktionellen Struktur“ hat, betont werden, daß infolge der Nichtberücksichtigung der feinsten Gefäßverzweigungen nicht ohne weiteres Analogien auf die Gesamtwirkung gezogen werden dürfen. Wenn man annimmt, daß die Empfindlichkeit der Gefäße nicht zu sehr von derjenigen in vivo verschieden ist, zeigt sich, daß eine relative Unterempfindlichkeit besteht, die — abgesehen von ungewöhnlichen Umständen — vielleicht sogar als ein besonderer Schutz angesehen werden darf. Hervorgehoben werden muß ferner, daß *hauptsächlich* eine Gefäß*erweiterung* beobachtet wurde; denn nur auf *Histamin* ($1 \mu\text{g/ml}$), *BaCl₂*, *Sauerstoff* und *Strophanthin* ($10 \mu\text{g/ml}$) kam es zu einer Verkürzung der Streifen. Im Vergleich dazu zeigten Mesenterialarterien, deren Struktur von HÄUSLER (1933) bis zu einem Durchmesser von 0,5 mm untersucht wurde und die sich als ring- und flachsraubiger Wandbau, aber niemals als aus Längsmuskulatur bestehend erwiesen hat, entweder von vornherein überhaupt eine Kontraktion (*Adrenalin*, *Noradrenalin*) oder eine viel stärkere als die Coronarien (*Histamin*, *Pituitrin*).

Zusammenfassung.

Zur Strukturanalyse auf pharmakodynamischem Wege wurden Ringe und unter verschiedenen Winkeln geschnittene Streifen von Coronararterien des Rindes auf ihr Verhalten ohne und unter Einwirkung von Pharmaka untersucht.

Hinsichtlich des Wandbaues ergeben sich 3 Gefäßabschnitte: Vom Ursprung bis in den Bereich des Sulcus coronarius (Durchmesser bis zu etwa 4 mm) überwiegt eine muskelschwache steilschraubige Faseranordnung. Im Gebiete des Sulcus coronarius (Durchmesser etwa 4—3 mm) treten Ringmuskeln hervor. Die herzspitzenwärts ziehenden kleinen Äste (Durchmesser bis zu etwa 0,5 mm) besitzen wiederum steilschraubig angeordnete Muskelemente. Solche bestehen auch an den Gefäßabgängen ringförmig strukturierter Arterien.

Ebenso wie die Mesenterialarterien zeigen auch die Coronarien Spontanrhythmik, die durch Pharmaka einerseits beschleunigt ausgelöst, andererseits unterdrückt werden kann.

Gesondert wird schließlich noch die Wirkung einzelner Pharmaka dargestellt und die funktionelle Bedeutung der Wandstruktur besprochen.

Literatur.

- ALELLA, A.: Ber. Physiol. Abt. B, **154**, 283 (1953). — BENNINGHOFF, A.: Handb. d. mikroskop. Anat. **6**, Berlin: Springer 1930. — DUANČIČ, VL.: Z. Kreislaufforschg. **34**, 21 (1942). — EDHOLM, G.: Anat. Anz. **42**, 124 (1912). — ELLENBERGER, W., u. H. BAUM: Vergleichende Anatomie der Haustiere. 14. Aufl. Berlin: August Hirschwald 1915. — HÄUSLER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **172**, 302 (1933). — KOECHER, P. H.: Z. mikrosk.-anat. Forschg. **50**, 273 (1941). — NEUMANN, R.: Virchows Arch. **303**, 1 (1939). — PICHLER, E., W. LAZARINI u. R. FILIPPI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **219**, 420 (1953). — PARK, E. A.: J. of Exper. Med. **16**, 532 (1912). — RATZENHOFER, M.: Mikroskopie (Wien) **6**, 165 (1951). — Verh. dtsch. path. Ges. 36. Tagung, 267 (1952). — ROTHLIN, E.: Biochem. Z. **111**, 219 (1920). — WIESEL, S.: Z. Heilkunde (Wien) **28**, 69 (1907). — WOLFF, C. K.: Virchows Arch. **276**, 259 (1930). — WOLKOFF, K.: Virchows Arch. **241**, 42 (1923). — ZIMMERMANN, K. W.: Z. Anat. **68**, 29 (1923).

Professor Dr. H. F. HÄUSLER, Graz (Österreich),
Pharmakologisches Institut der Universität.

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. K. BINGOLD).

Über den Einfluß des Coffeins auf Nierendurchblutung, Glomerulusfiltrat und Diurese des Menschen.

Von

HANS SCHWALB und HELMUT HENSEL.

(Eingegangen am 15. August 1953.)

Daß die Diurese nach Coffein und den verwandten Purinderivaten durch deren direkte Wirkung auf die Nieren zustandekommt, ist seit den Untersuchungen an der isolierten Niere und am Herz-Lungen-Nierenpräparat durch RICHARDS u. PLANT, VERNEY u. WINTON und STARLING u. VERNEY bewiesen. Daran ändert auch die Tatsache nichts, daß gewisse extrarenale Faktoren für den Eintritt der Diurese nach Coffein und deren Ausmaß von Bedeutung sind. Hierher gehört die Feststellung, daß ohne ein genügend großes Flüssigkeitsangebot eine Diurese nicht erfolgen kann (CUSHNY u. LAMBIE, PREOBRASCHENSKY, MOSONY u. GOEMERI, LIE).

Die Frage nach dem Angriffspunkt des Coffeins in der Niere konnte aber bis heute noch nicht befriedigend beantwortet werden. Als gesichert kann lediglich die Erweiterung der Nierengefäße gelten, die durch eine direkte Einwirkung auf die Gefäßmuskulatur peripher der Nervenendigungen erfolgt und auch durch Barium nicht gehemmt werden kann (SALLSTRÖM). Daraus resultiert eine Vermehrung der Nierendurchblutung, die erstmals von PHILIPS u. BRADFORD, von LOEWI, FLETSCHER u. HENDERSON auch an der entnervten Niere und schließlich von vielen anderen Autoren mit verschiedenen Methoden festgestellt werden konnte (OZAKI, JANSSEN u. REIN, VERNEY u. WINTON, WALKER u. Mitarb. u. a.).

Es wurde jedoch schon mehrfach beschrieben, daß diese Steigerung der Nierendurchblutung unter Coffein nicht die wesentliche Ursache der Diurese sei, da die Vermehrung der Harnmenge auch bei gleichbleibender Durchströmung zustande käme (CUSHNY u. LAMBIE, WALKER u. Mitarb., R. SCHMIDT, HARTWICH, SCHROEDER, JANSSEN u. REIN, ESCHER u. Mitarb.). Lediglich LOEWI u. Mitarb. kamen zu dem Schluß, die vermehrte Durchblutung sei immer die Ursache der Diurese.

Weniger übereinstimmend sind die Feststellungen über das Verhalten der Glomerulusfiltration. Die an der lebenden Niere und an Nierenschnitten gemachten Beobachtungen, daß unter Coffeininwirkung eine Erweiterung und Vermehrung der durchbluteten Glomeruli stattfindet, führte zu der Ansicht, daß die Steigerung der glomerulären Filtration der wesentliche Faktor für das Zustandekommen der Harnvermehrung darstelle (RICHARDS u. SCHMIDT, HAYMAN u. STARR, E. FREY, u. J. FREY). Clearance-Bestimmungen mit „Nichtschwellenstoffen“ wie Inulin und Kreatinin, die in den Tubuluszellen nicht rückresorbiert werden, ermöglichten schließlich die Untersuchung des Glomerulusfiltrats auch beim Menschen (REH-

BERG, POPPER u. MANDEL, SMITH). Es ergaben sich dabei sehr unterschiedliche Werte bezüglich der unter Coffein und anderen Xanthinderivaten auftretenden Änderungen (POPPER u. MANDEL, BERGLUND u. LUNDH, GUKELBERGER, SPÜHLER, FULTON, DAVENPORT u. Mitarb., CHROMETZKA u. UNGER, DAVIES u. SHOCK). Aus diesen Untersuchungen ist jedenfalls zu entnehmen, daß die Harnvermehrung nach Coffein im wesentlichen auf eine Hemmung der tubulären Rückresorption zurückgeführt werden muß.

Wir haben uns nun zur Aufgabe gemacht, die Nierenfunktion beim Menschen unter der Einwirkung des Coffeins durch gleichzeitige Bestimmung der Wasser-, Chlorid- und Harnstoffausscheidung, des Glomerulusfiltrats und der gesamten Plasmadurchströmung zu studieren. Es soll dabei untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß einzelne dieser Faktoren zueinander in Beziehung stehen. Weiterhin interessierte die Frage, ob die Ansprechbarkeit der Nierengefäße auf Coffein mit Änderungen des peripheren arteriellen Kreislaufs parallel geht. Durch einen Vergleich dieser verschiedenen Faktoren war zu erwarten, einen Einblick in den Mechanismus der Coffeindiurese zu bekommen.

Methodik.

Zur Beurteilung der Nierendurchblutung diente die Bestimmung des effektiven Nierenplasmastroms mit der p-Aminohippursäure-Clearance nach SMITH u. Mitarb. bei einer konstanten Plasmakonzentration von 2—3 mg% p-Aminohippursäure (PAH). Es ist festgestellt, daß das Coffein keinen Einfluß auf den tubulären Transport der PAH hat, so daß eine Änderung der PAH-Clearance unter Coffein auf eine Änderung der gesamten Plasmadurchströmung der Nieren zurückgeführt werden kann (HANDLEY, TELFORD u. LA FORGE).

Die Bestimmung des Glomerulusfiltrats erfolgte nach der Methode der endogenen Kreatininclearance nach POPPER u. MANDEL. Die Prüfung der Diurese erstreckte sich auf die Messung der Harnmengen, der Chlorid- und Harnstoffausscheidung. Letztere wurden wiederum nach dem Clearance-Prinzip von VAN SLYKE u. Mitarb. bestimmt, da nur unter Berücksichtigung des jeweiligen Blutspiegels aus der Größe der Ausscheidung ein Rückschluß auf die tatsächliche Nierenleistung gezogen werden kann. Die Bestimmung der Chloride erfolgte nach der Methode von VOLHARD, die des Harnstoffs nach der Urease-Methode von CONWAY.

Aus dem Vergleich zwischen Glomerulusfiltrat und definitiver Harnmenge ergibt sich die Wasserrückresorption in Prozent des Glomerulusfiltrats nach der Formel:

$$R = \frac{\text{Kreatininclearance} - \text{Harnvol./min} \times 100}{\text{Kreatininclearance}}.$$

Um die Beziehungen der Chlorid- und Harnstoffausscheidung zu der in den Glomeruli filtrierten Chlorid- und Harnstoffmenge zu erhalten, wurde für beide Stoffe der Exkretionsindex errechnet nach der REHBERGSchen Formel

$$\text{E. I. für } X \text{ in Prozent} = \frac{\text{effekt. Ausscheidung/min}}{\text{filtrierte Ausscheidung/min}} = \frac{UX \times V \times 100}{F \times Pl X},$$

wobei U = Konzentration von X im Harn, Pl = Konzentration von X im Plasma, V = Harnvolumen/min, F = Glomerulusfiltrat = Kreatininclearance/min.

Die kreislaufanalytischen Untersuchungen wurden gemeinsam mit Herrn Dr. SCHIMMLER nach der sphymographischen Methode der O. FRANKSchen Schule durchgeführt. Das Schlag- und Minutenvolumen berechneten wir nach der Formel von BROEMSER und RANKE.

Versuchsanordnung.

Die Untersuchungen wurden an 26 Personen durchgeführt. Die Auswahl erfolgte nach dem Gesichtspunkt, die Coffeinwirkung bei verschiedenen Ausgangswerten beurteilen zu können. Es wurden deshalb neben gesunden Personen auch solche mit bereits erfolgter Einschränkung des Glomerulusfiltrates und der Nierendurchblutung herangezogen, wie sie bei arterieller Hypertonie, bei Nephrosklerose und chronischer Nephritis vorkommt.

Die zu untersuchende Person erhielt nüchtern 5 ml p-Aminohippursäure („Nephrotest“ der Fa. Casella) intravenös, nach 20 min eine Lösung von 2 g p-Aminohippursäure in 300 ml 5,7%iger Traubenzuckerlösung als intravenöse Dauertropf-infusion, 25 Tropfen pro Minute. 30 min nach Infusionsbeginn erfolgte die erste Blutentnahme und Blasenspülung (Verweilkatheter); der Harn wurde verworfen. Weitere Harn- und Blutentnahmen, die zur Berechnung der Clearanceperioden herangezogen wurden, nach jeweils 20 min. Nach den 2 ersten Untersuchungsperioden von je 20 min erfolgte die intravenöse Injektion von 0,25 g Coffein. natr. salicylic. Vor Beginn des Versuches wurden 250 ml Flüssigkeit zu trinken gegeben, anschließend alle 20 min 50 ml. Eine Wasserdiurese war bei Zufuhr solch kleiner Flüssigkeitsmengen allein nicht zu erwarten.

Ergebnisse.

Die physiologische Schwankungsbreite der hier untersuchten Faktoren ist beträchtlich und im Einzelfall von ganz verschiedenem Ausmaß. Dies betrifft besonders die Wasser-, Salz- und Harnstoffausscheidung, deren Größe zum Teil wieder voneinander abhängig ist. Auch die Höhe des Glomerulusfiltrates und des Nierenplasmastromes unterliegt ohne ersichtliche äußere Einflüsse gewissen Schwankungen, die in der Tabelle in den beiden Versuchsperioden vor der Coffeineinwirkung zum Ausdruck kommen. Die Berücksichtigung einer korrigierten mittleren Abweichung in den Vorperioden bei der Beurteilung des Coffeineffektes würde im Einzelfall irreführen und wurde daher bewußt vernachlässigt. Eine Änderung der untersuchten Faktoren wurde aber nur dann auf die Coffeinwirkung bezogen, wenn sie jeweils die Differenz der Vorperioden deutlich überschritten hat.

1. Der *Nierenplasmastrom* (Cl. PAH) nahm nach Coffein in 16 von 26 Fällen zu und war nicht abhängig von der Größe des Ausgangswertes vor der Coffeinwirkung. Dieser Effekt ließ sich vor allem in den ersten 20 min nach der Coffeininjektion feststellen, bei sehr ausgeprägten Steigerungen auch noch nach 40 min. Zu diesem Zeitpunkt wurden manchmal die Ausgangswerte auch gering unterschritten. In 10 Fällen

trat keine verwertbare Änderung des Plasmastromes oder schon anfangs eine Verminderung ein. Darunter befanden sich 7 Personen mit chronischer diffuser Glomerulonephritis oder maligner Nephrosklerose.

2. Das *Glomerulusfiltrat* (Cl. Kreatinin) nahm nach Coffein nur in 12 Fällen zu und dann nur in geringerem Ausmaß als der gesamte Plasmadurchfluß. Eine geringe Abhängigkeit der möglichen Filtratsteigerung von der Größe des Ausgangswertes ist zu erkennen, zumindest was das Ausmaß der Änderung betrifft. Niedrige Filtratmengen können unter Coffein prozentual stärker zunehmen als hohe. Bei sämtlichen chronischen Nephritiden und malignen Nephrosklerosen war eine Steigerung des Glomerulusfiltrats nach Coffein wiederum nicht erfolgt.

3. Die *Wasserausscheidung* war in den ersten 20 min nach der Coffeinjektion bei 17 von 26 Personen mehr oder weniger deutlich vermehrt, bei 9 Personen auch noch nach 40 min, um so mehr dann, wenn schon vorher eine stärkere Zunahme erfolgt war. Das Ausmaß des wasserdiuretischen Effektes war nur bis zu einem gewissen Grade unabhängig von der Größe der vorangehenden Harnmenge; Steigerungen der Ausscheidung um 100% oder mehr kamen vor bei Ausgangswerten von 0,5 bis 5,0 ml Harn/min. Bei höheren Ausgangswerten war die prozentuale Zunahme jedoch nicht mehr so stark. Befanden sich die Nieren im Zustande einer Wasserdiurese, dann war schließlich unter Coffein auch keine weitere Zunahme der Harnmengen mehr möglich. So fand sich bei den 9 Fällen ohne Steigerung der Wasserausscheidung allein 6mal bereits anfangs ein Harnvolumen von über 5,5 ml/min. Unabhängig davon reagierten Personen mit chronischer Nephritis auf Coffein nicht mit einer Zunahme der Harnmenge.

Die *Wasserrückresorption* in den Tubuli verringerte sich nach Coffein bei 20 von 26 Fällen zum Teil erheblich. Dieser Effekt trat auch dann ein, wenn eine Steigerung des Glomerulusfiltrats nicht zu verzeichnen war. Das bedeutet aber, daß die beschriebene Mehrausscheidung von Wasser zum größeren Teil durch verminderte Rückresorption zustandekommen muß. Nur 3mal war die Harnmenge allein auf Grund gesteigerter Filtration vermehrt.

4. Die *Chloridausscheidung* war nach Coffein stets erhöht, wenn gleichzeitig eine Mehrausscheidung von Wasser zustandekam, besonders aber dann, wenn vor der Coffeinjektion wenig Chloride im Harn vorhanden waren. Wir fanden sie manchmal aber auch dann gesteigert, wenn der wasserdiuretische Effekt ausblieb. Eine verwertbare Änderung des Chloridblutspiegels trat niemals ein.

In allen Fällen mit vermehrter Chloridausscheidung nach Coffein erfolgte eine Erhöhung des *Exkretionsindex*, d. h. die Menge der mehr ausgeschiedenen Chloride resultierte weniger aus einer Steigerung der Chloridfiltration als vielmehr aus einer Abnahme der tubulären Rück-

resorption. Auch dann, wenn das Glomerulusfiltrat unter Coffein nicht größer wurde oder sogar zurückging, konnte diese verminderte Chloridrückresorption beobachtet werden. Sie hielt außerdem manchmal länger an als die Zunahme des Filtrats. Die Mehrausscheidung der Chloride kam also im wesentlichen nicht durch eine Steigerung des Glomerulusfiltrats zustande.

5. Die *Harnstoffausscheidung* ging weitgehend mit der Größe der Wasserdiurese parallel. Trat eine größere Mehrausscheidung von Harnstoff auf, so ließ sie sich noch weniger durch eine etwa entsprechende Erhöhung des Glomerulusfiltrats erklären, als es schon bei den Chloriden der Fall war. Bei sehr großen Diuresen konnte die gesamte filtrierte Harnstoffmenge im definitiven Harn erscheinen. Auch unabhängig von dem Einfluß des Coffein trat die Anpassung der tubulären Rückresorption an das Glomerulusfiltrat in Erscheinung. Bezeichnend hierfür war z. B. die völlige Hemmung der Harnstoffrückresorption in einem Falle (Nr. 23), in dem das Filtrat sehr eingeschränkt war, und zwar auf Grund einer starken Eindickung des Blutes (Hämatokrit 75%) und einer daraus resultierenden Verlangsamung der Durchströmung.

Die weitgehende Unabhängigkeit der Harnstoffausscheidung von einer entsprechenden Größe des Filtrats geht auch aus dem zum Teil erheblich gesteigerten Exkretionsindex nach Coffein hervor.

Beziehungen zwischen der Größe der Harnstoffausscheidung zu der der Chloride bestanden unter der Coffeinwirkung nicht. Eine Abnahme der Harnstoffkonzentration des Blutes konnte nach Coffein nicht beobachtet werden.

6. Der *periphere Kreislauf*. Der Blutdruck stieg nach Coffein in fast allen Fällen geringfügig an. Bei bereits erhöhtem Druck war dieser Effekt ausgeprägter. In 4 Fällen ging die Drucksteigerung nicht mit einer Vermehrung des Filtrats und der Harnmengen parallel. Andererseits konnte auch bei gleichbleibendem Druck eine Diurese erfolgen.

Wir haben ferner bei 8 Personen gleichzeitig mit der Nierenfunktion das Herzminutenvolumen und den peripheren arteriellen Widerstand bestimmt. Das Minutenvolumen erhöhte sich dabei 6mal; entsprechend nahm der periphere Gefäßwiderstand ab. Die Vermehrung des Nierenplasmastroms erfolgte nicht immer gleichzeitig mit der des Minutenvolumens. Sie scheint zum Teil früher einzusetzen als diese und sich nur über einen kürzeren Zeitraum zu erstrecken. Sowohl eine Änderung des peripheren Kreislaufs als eine solche der Nierendurchblutung kamen getrennt voneinander vor; d. h. das eventuell zu beobachtende Nichtansprechen der Nierengefäße bedeutet nicht, daß gleichzeitig eine Unempfindlichkeit des gesamten Kreislaufs und insbesondere der peripheren Gefäßbezirke gegenüber Coffein vorhanden sein muß, wie es z. B. bei einer Gewöhnung möglich wäre (s. Tab. 2).

Diskussion.

Die Ergebnisse berechtigen zu dem Schluß, daß die Coffeindiurese im wesentlichen durch eine Abnahme der tubulären Rückresorption zustandekommt, welche in ganz besonderem Maße Wasser und Chloride betrifft. Hierin findet sich eine Übereinstimmung mit den Beobachtungen von SPÜHLER, NEWMAN, DAVIS u. SHOCK, SINCLAIR, SMITH u. Mitarb. und GREEN. Man darf sogar annehmen, daß das Coffein primär die Kochsalzrückresorption hemmt, da nach den Untersuchungen von LIE die Kochsalzausscheidung nach Coffein im Gegensatz zu der des Wassers durch gleichzeitige Gabe von Pituitrin nicht unterdrückt wird.

Die Vermehrung des Glomerulusfiltrats spielt demgegenüber eine untergeordnete Rolle, wenngleich wir sie häufiger beobachten konnten, als es sonst mit gleicher oder ähnlicher Methodik unter der Einwirkung von Xanthinderivaten gefunden wurde (SPÜHLER, BERGLUND u. LUNDH, POPPER u. MANDEL). Dieser Effekt kann, da er nur kurz andauert, nicht oder nur andeutungsweise zum Ausdruck kommen, wenn das Filtrat/Minute aus einem größeren Zeitabschnitt nach der Coffeininjektion berechnet wird (SCHWALB u. HENSEL). Sowohl der geringe Blutdruckanstieg nach Coffein als auch der vermehrte Blutdurchfluß infolge einer Erweiterung der afferenten glomerulären Arteriolen können die Vermehrung des Glomerulusfiltrats erklären. Auf eine Zunahme der glomerulären Durchblutung, wie sie bei den mikroskopischen Untersuchungen von E. u. J. FREY an Nierenschnitten offensichtlich in Erscheinung tritt, kann also auch auf Grund der hier geübten Methodik beim Menschen in einem Teil der Fälle geschlossen werden. Nur scheint dieser Mechanismus für den Ablauf und die Größe der Diurese nicht die entscheidende Bedeutung zu haben.

In gleicher Weise besteht kein Grund, eine direkte Beziehung zwischen der Größe der Nierendurchblutung und dem Ausmaß der Diurese anzunehmen. Sowohl die eingangs erwähnten tierexperimentellen Untersuchungen als auch die eigenen in dieser Arbeit niedergelegten Beobachtungen sprechen dafür, daß die Größe der Coffeindiurese nicht abhängig sein kann von einer entsprechend großen Steigerung der Nierendurchblutung. An der auffallenden Häufung des gleichzeitigen Auftretens beider Effekte kann jedoch ebenso wenig vorübergegangen werden wie an der Tatsache, daß fast stets beim Ausbleiben der Diurese nach Coffein auch keine Vermehrung des Plasmadurchflusses festzustellen war. Der Ablauf der Diurese läßt sich nur schwer nach rein mechanischen Gesichtspunkten erklären. Es wäre zu erwägen, ob nicht allein durch eine plötzliche Mehrdurchblutung, wie sie unter Coffein zustandekommen kann, ein Reiz auf die Nieren ausgeübt wird, der auch unabhängig von einer dadurch möglichen Filtratsteigerung eine Diurese auslösen kann. Zumindest dürfte dies dann zutreffen, wenn eine sehr

ausgeprägte Steigerung der Nierendurchblutung erfolgt. Das Ausmaß der Diurese bliebe dann trotzdem abhängig in erster Linie von der jeweiligen Größe der tubulären Rückresorption bzw. von dem Zusammenwirken des glomerulären und tabulären Systems.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Es wurde bei 26 Personen der Nierenplasmastrom, das Glomerulusfiltrat, die Wasser-, Chlorid- und Harnstoffausscheidung vor und nach intravenöser Injektion von 0,25 g Coffein. natr. salicylic. bestimmt, bei 8 Personen gleichzeitig das Herzminutenvolumen und der periphere Gefäßwiderstand.

Coffein ist in der Lage, die gesamte Plasmadurchströmung der Nieren, das Glomerulusfiltrat und die Ausscheidung von Wasser, Chlorid und Harnstoff zu steigern. In etwa der Hälfte der beobachteten Fälle trat dies gleichzeitig in Erscheinung. Eine unbedingte Abhängigkeit des diuretischen Effektes von einer entsprechenden Änderung der Nierendurchblutung oder der Filtratmenge war aber nicht zu erkennen. Die Diurese kann länger anhalten als eine etwa erfolgende Vermehrung des Plasmastromes, sie kommt auch ohne eine solche und ohne nennenswerte Steigerung des Glomerulusfiltrates vor.

Die Coffeindiurese ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Ausscheidung von Chloriden und Harnstoff, wobei die Vermehrung der Chloride am konstantesten zu finden ist, selbst dann, wenn der wasserduretische Effekt ausbleibt. Die Harnstoffausscheidung zeigt dagegen eine größere Abhängigkeit von der Harnmenge. Die Ausgangslage vor der Coffeineinwirkung spielt in besonderem Maße nur für die Größe der Wasser- und Harnstoffmehrausscheidung eine Rolle. Das wesentliche beim Zustandekommen der Coffeindiurese scheint weniger die Erhöhung

Tabelle 1a. *Nierenplasmastrom, Glomerulusfiltrat, Harnvolumen und Wasserrückresorption vor und nach Injektion von 0,25 g Coffein. natr. salicylicum.*

Nr.	Name	Geschl.	Alter	RR mm Hg	PD cm ³ /min.	GF cm ³ /min	V cm ³ /min	R %
1.	Vo.	m	38	230/110 250/110 250/130	578 606 575 241	111 121 168 130	4,5 5,0 9,8 8,4	97 96 94 93
2.	Sc.	m	45	130/80 135/80 140/80	235 228 293 305	52 48 63 60	1,2 1,1 2,8 6,0	98 98 95 90
3.	Kl.	w	56	140/90 140/90 145/90	326 430 667 371	82 89 75 73	0,8 2,4 5,9 5,7	99 97 92 93
4.	Th.	m	53	145/90 145/90 150/90	732 697 1140 897	163 167 168 161	2,3 2,6 5,0 7,4	98 98 97 95
5.	Mo.	m	60	145/75 150/70 150/75	578 567 1015 968	210 228 260 164	1,5 2,0 4,0 4,7	99 99 98 97

Tabelle 1a. (Fortsetzung.)

Nr.	Name	Geschl.	Alter	RR mm Hg	PD cm ³ /min	GF cm ³ /min	V cm ³ /min	R %
6.	Un.	m	41	120/80 125/90 130/90	414 453 737 712	136 133 148 133	4,0 4,1 8,0 8,1	97 96 95 93
7.	Ve.	m	36	135/95 130/90 150/110	249 313 397 292	101 93 98 76	6,3 7,4 11,1 9,6	95 94 88 89
8.	Ma.	m	73	210/95 225/90 210/85	300 278 393 321	97 74 114 105	0,7 0,6 1,5 2,2	98 99 98 98
9.	Ko.	w	33	170/120 205/135 185/120	225 239 299 262	97 91 107 94	5,0 6,3 9,0 5,9	95 93 84 93
10.	Gr.	w	56	170/100 190/105 170/100	354 348 505 433	83 87 92 87	1,7 1,7 5,9 2,7	97 97 93 96
11.	De.	m	42	140/105 160/110 160/105	347 338 571 375	86 81 112 89	3,4 3,2 9,9 13,9	96 96 90 84
12.	Dr.	m	36	120/85 140/90 130/90	639 635 413 567	138 135 117 136	7,1 6,7 6,4 2,2	96 97 94 98
13.	Sa.	w	64	190/90 180/100 175/100	363 231 541 298	123 107 128 114	6,1 9,7 8,8 5,4	95 91 93 95
14.	Ha.	w	60	120/90 120/90 130/90	272 318 332 292	71 68 94 59	1,0 2,6 16,2 9,9	98 96 83 83
15.	Ib.	w	60	160/95 180/95 160/95	106 156 260 85	29 39 76 20	1,1 1,5 2,6 1,0	96 96 96 95
16.	Ro.	w	33	200/95 220/90 215/95	172 155 324 340	106 103 168 126	5,2 4,1 8,1 5,9	95 96 95 95
17.	Ka.	w	28	130/90 135/90 130/90	424 275 208 105	97 86 43 42	3,3 3,4 2,8 2,6	99 97 93 92
18.	Ma.	m	45	140/80 150/80 150/80	576 462 370 436	120 125 97 118	8,9 9,9 8,2 4,5	93 92 91 96
19.	De.	m	36	130/95 140/95 145/95	501 433 462 695	99 70 76 121	6,9 7,2 1,5 2,7	93 89 98 97
20.	Hn.	m	48	135/80 140/85 145/80	474 409 643 489	130 115 143 127	0,9 0,8 1,3 1,0	99 99 99 99
21.	La.	w	52	130/80 140/100 140/100	306 285 162 134	91 77 59 34	4,2 5,4 5,0 1,9	95 92 91 95
22.	Se.	m	52	220/145 250/160 250/160	245 249 225 196	73 80 71 70	3,5 4,9 4,1 2,3	96 93 94 96
23.	Ed.	w	63	140/90 140/90 160/90	264 237 289 249	55 59 49 41	1,4 2,7 5,3 2,1	97 95 89 95
24.	Mu.	w	21	125/90 125/95 130/95	336 351 379 384	84 99 69 68	0,9 1,4 1,5 1,6	99 98 98 97
25.	Bt.	w	46	160/105 160/105 175/100	328 344 434 362	77 75 97 86	8,0 6,6 5,9 3,8	90 91 94 96
26.	Pa.	m	56	200/130 215/130 210/125	221 236 179 152	81 87 72 54	3,4 4,3 5,1 4,0	96 95 93 91

des Filtrats als die Hemmung der tubulären Rückresorption zu sein; dafür sprechen die errechnete Abnahme der Wasserrückresorption wie auch die Zunahme der Exkretionsindices für Harnstoff und Chlorid.

In fast einem Drittel der Fälle war auf keine der untersuchten Größen eine Steigerung durch Coffein festzustellen, manchmal sogar eine Abnahme insbesondere des Filtrats. In dieser Gruppe befanden sich auf-

Tabelle 1b. *Clearance und Exkretionsindex für Chloride und Harnstoff vor und nach Injektion von 0,25 g Coffein. natr. salicylicum.*

Nr.	Cl-Chlorid		EI-Chlorid		Cl-Harnstoff		EI-Harnstoff	
4.	2,86	2,54	1,7	1,5	67	71	41,1	43,7
	3,95	3,78	2,3	2,3	94	88	55,6	54,3
5.	3,2	3,61	1,5	1,6	58	63	27,6	27,4
	2,98	5,73	1,1	3,5	79	84	30,4	50,9
6.	3,11	3,07	2,3	2,3	47	38	34,6	28,4
	4,59	4,38	3,1	3,3	63	55	42,1	41,6
7.	1,54	1,3	1,5	1,2	47	125	46,0	99,9
	2,96	0,81	3,0	1,1	108	23	101,0	30,4
8.	0,73	0,56	0,8	0,7	37	28	38,7	37,7
	1,2	0,7	1,1	0,7	59	68	51,9	64,7
9.	1,28	1,44	1,3	1,6	56	54,5	55,7	59,6
	2,36	1,06	2,2	1,1	77	70	72,2	72,6
10.	1,45	1,26	1,7	1,9	35	91	42,6	51,9
	2,53	2,14	2,7	2,5	66	60	71,3	68,9
11.	3,3	3,84	3,7	4,7	57	66	66,3	80,4
	5,95	3,89	5,3	4,3	96	81	85,0	90,0
18.	2,74	2,89	2,3	2,3	51	58	40,8	46,4
	3,0	3,84	3,1	3,3	47	64	84,4	54,2
19.	0,52	0,41	0,5	0,6	54	44,5	55,5	63,5
	0,29	0,54	0,4	0,4	27	51	35,9	41,9
20.	0,68	0,37	0,5	0,3	45	38,5	34,3	33,5
	2,14	1,81	1,5	1,4	52	47	36,2	36,8
21.	0,49	0,32	0,5	0,4	31	28	33,6	36,4
	0,49	0,2	0,8	0,5	26	20	44,1	52,6
22.	2,66	3,1	3,6	3,8	48	47	65,7	58,1
	2,84	1,84	4,0	2,6	42	36	58,7	51,3
23.	0,73	1,07	1,3	1,8	63	70	113,5	117,2
	1,48	1,02	3,0	2,4	58	43	116,1	104,1
24.	0,17	0,29	0,2	0,3	49	57	58,3	57,4
	0,23	0,2	0,3	0,3	34	44	34,3	44,1
25.	0,59	0,95	0,8	1,3	53	65	69,7	86,5
	1,65	1,38	1,7	1,6	73	55	74,5	63,9
26.	2,52	3,26	3,1	3,7	44	49	53,8	56,3
	3,88	2,98	5,4	5,5	48	43,5	66,7	81,2

Die Nummerierung der Versuche bezieht sich auf die der vorangehenden Tabelle 1a.

fallenderweise sämtliche untersuchten chronischen Nephritiden und malignen Nephrosklerosen.

Die nach Coffein oft erfolgende Steigerung des Herzminutenvolumens trifft nicht immer gleichzeitig mit einer Vermehrung des Nierenplasmastroms zusammen. Der arterielle Mitteldruck zeigt meist einen geringen Anstieg. Die Harnvermehrung nach Coffein tritt zwar häufig gleichzeitig mit diesen Änderungen der arteriellen Kreislaufdynamik auf, kommt jedoch auch ohne diese vor.

Tabelle 2. Arterielle Kreislaufdynamik, Nierenplasmaström und Glomerulusfiltrat vor und nach Injektion von 0,25 g Coffein, natr. salicylicum.

Nr.	Pm		Vm		W		PD		GF		
14.	105		4,9		1725		318		71		Diurese
	105	110	5,5	8,1	1505	1065	332	292	94	59	
25.	125		7,1		1510		344		77		Salzdiurese
	130	135	7,2	9,1	1465	1205	434	362	97	86	
24.	110		2,8		3130		351		99		Keine
	115	112	3,4	3,1	2770	3060	379	384	69	68	Diurese
8.	152		10,9		1115		300		97		Keine
	157	147	12,2	14,1	1025	840	393	321	114	105	Diurese
22.	185		2,7		5640		242		80		Keine
	202	205	3,2	4,0	4062	5482	225	196	71	70	Diurese
26.	162		5,6		2190		236		87		Keine eind.
	168	167	5,1	5,1	2770	2765	179	152	71	53	Harnverm.
9.	146		3,4		3455		322		94		Diurese
	167	152	4,6	3,3	2856	3755	299	262	107	94	
10.	132		7,2		1495		351		83		Diurese
	145	140	6,4	7,6	1800	1467	505	433	92	87	

Zeichenerklärung für die Tabellen. Für jeden Fall sind die Werte vor der Coffeininjektion in der oberen, die nach der Injektion in der unteren der beiden Reihen angegeben. Sie stellen Mittelwerte/min der Faktoren dar, die aus 20 min-Perioden errechnet wurden. — RR Blutdruck nach RIVA-ROCCI in mm Hg; PD Plasma-durchströmung der Nieren (Clearance der P-Aminohippursäure) in ml/min; GF Glomerulusfiltrat (Clearance des endogenen Kreatinin) in ml/min; V Harnvolumen ml/min; R Wasserrückresorption in % des Glomerulusfiltrats; Cl-Chlorid Chlorid-Clearance ml/min.; Cl-Harnstoff Harnstoff-Clearance ml/min; EI-Chlorid Exkretionsindex für Chloride; EI-Harnstoff Exkretionsindex für Harnstoff; Pm Arterieller Mitteldruck mm Hg; Vm Herz-Minutenvolumen ltr/min; W Peripherer Widerstand in $\frac{\text{dyn} \times \text{sec}}{\text{cm}^5}$.

Literatur.

BERGLUND u. LUNDH: Acta med. scand. (Stockh.) **86**, 216 (1935). — BROEMSER u. RANKE: Z. Biol. **90**, 467 (1930). — Z. Kreislaufforsch. **25**, 11 (1933). — CHROMETZKA u. UNGER: Z. exper. Med. **80**, 261 (1931). — CUSHNY u. LAMBIE: J. of Physiol. **55**, 276 (1921). — DAVIES u. SHOCK: J. Clin. Invest. **28**, 1459 (1949). — ESCHER u. M.: Federat. Proc. 731, zit. nach SMITH, H.: The Kidney, 1951. —

FREY, E., u. J. FREY: Die Funktionen der gesunden u. kranken Niere. Berlin: Springer 1950. — FULTON, DAVENPORT and M.: J. of Physiol. **108**, 99 (1934). — GREEN and M.: Federat. Proc. **8**, 296 (1949). — GUKELBERGER: zit. nach SPÜHLER. — HANDLEY, TELFORD and LA FORGE: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 187 (1949). — HARTWICH: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **111**, 206 (1926). — HAYMAN and STARR: J. of Exper. Med. **42**, 641 (1925). — JANSSEN u. REIN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **128**, 107 (1928). — Ber. Ges. Biol. **42**, 567 (1928). — LIE: J. of Physiol. **92**, 619 (1930). — LOEWI, FLETSCHER u. HENDERSON: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **53**, 15 (1905). — MOSONY u. GOEMERI: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **124**, 73 (1927). — NEWMAN: Bull. Hopkins Hosp. **81**, 430 (1947). — OZAKI: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **123**, 305 (1927). — PEROBRASCHENSKY: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 330 (1928). — PHILIPS and BRADFORD: J. of Physiol. **8**, 117 (1887). — POPPER u. MANDEL: Erg. inn. Med. **53**, 685 (1937). — Biochem. Z. **291**, 354 (1937). — REHBERG: Biochemic. J. **20**, 447, 477 (1926). — Zbl. inn. Med. **52**, 589 (1929). — RICHARD and SCHMIDT: J. of Physiol. **59**, 489 (1922). — RICHARDS and PLANT: J. of Pharmacol. **7**, 485 (1915). — SALLSTROEM: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **45**, 169 (1924). — SCHMIDT, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **95**, 267 (1922). — SCHRÖDER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **22**, 39 (1886); **24**, 85 (1888). — SCHWALB u. HENSEL: Med. Klin. **1952**, 1421. — SINCLAIR, SMITH and M.: Bull. Hopkins Hosp. **84**, 369 (1949). — SMITH, H. W.: The Kidney. New York: Oxford University Press 1951. — SMITH, FINKELSTEIN and M.: J. Clin. Invest. **24**, 388 (1945). — SPÜHLER: Zur Physiopathologie der Niere. Bern: Huber 1946. — VAN SLYKE and M.: J. Clin. Invest. **6**, 458 (1929). — STARLING and VERNEY: Proc. Roy. Soc., Edinburgh Sect. B. **97**, 321 (1925). — VERNEY and WINTON: J. of Physiol. **69**, 153 (1930). — WALKER, SCHMIDT and M.: J. of Physiol. **118**, 95 (1937).

Dr. HANS SCHWALB, I. Med. Klinik der Universität München.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. KUSCHINSKY).

Über die Wirkung hypotoner Salzlösungen auf das Rattenzwerchfell.

Von

HEINZ LÜLLMANN und ERICH MUSCHOLL.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Oktober 1953.)

Am isolierten Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte untersuchten wir den Einfluß von Änderungen des Natrium- und Kaliumgradienten auf die Zuckungshöhe. Wir prüften die Wirkung hypotoner Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung auf die Kontraktionskraft mehr oder minder ermüdeter Muskulatur und beschreiben eine durch hypotone Salzlösung hervorgerufene, über Stunden bestehende Verbesserung der Hubhöhe elektrisch gereizter Muskeln.

Methodik.

Wir verwendeten das Phrenicus-Zwerchfell-Präparat der Ratte, wie es von BÜLBRING angegeben wurde; die Einzelheiten der von uns benutzten elektrischen Reizung teilten wir früher mit (LÜLLMANN, FÖRSTER u. WESTERMANN). Die Tyrodelösung, die als Badflüssigkeit benutzt wurde, hatte folgende Zusammensetzung: 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g CaCl_2 ; 0,1 g MgCl_2 ; 1,0 g NaHCO_3 ; 0,05 g NaH_2PO_4 ; 2,0 g Glucose; Aqua dest. ad 1000,0 ml. Durch das Bad wurde Sauerstoff in feinblasiger Form geleitet. Die Registrierung erfolgte „halbisometrisch“.

Die Denervierung des Zwerchfelles wurde einseitig in Evipannarkose* (150 mg N-Methyl-cyclohexenylmethyl-barbitursaures Natrium/kg Ratte intraperitoneal) durchgeführt. Der Hals wurde paramedian durch einen etwa 10 mm langen Hautschnitt eröffnet, von dort der N. phrenicus an dem Punkt aufgesucht, an dem der Nerv den Plexus brachialis nach caudal verläßt, und ein 10—15 mm langes Stück exhärtet. Bis zur Benutzung des denervierten Muskels wurde mindestens 14 Tage gewartet.

Versuchsergebnisse.

1. Ersatz der isotonen Tyrodelösung durch hypotone Salzlösung.

Die Zuckungshöhe eines direkt oder indirekt gereizten Zwerchfelles nimmt im Laufe von Stunden ab. Wurde in diesem Zustand der Ermüdung die Badflüssigkeit, die aus isotoner Tyrodelösung der angegebenen Zusammensetzung besteht, gegen eine hypotone Lösung ausgetauscht, in der das Verhältnis der Ionen untereinander dasselbe wie das der Tyrodelösung war, so zeigte der Muskel eine starke Zunahme

* Wir danken der Fa. Bayer, Leverkusen, für die Überlassung des Präparates.

der Zuckungshöhe (Abb. 1). Diese Verbesserung der Muskelleistung blieb über Stunden erhalten und betraf sowohl die durch direkte wie auch die durch indirekte Reizung ausgelöste Kontraktion. Erneuter Austausch der Badflüssigkeit, also Zusatz der isotonen Salzlösung, führte zu einer sehr schnell einsetzenden Verminderung der Hubhöhe. Diese durch hypotone Salzlösung, oder anders gesagt, durch Verdünnung der Badflüssigkeit mit Aqua dest. erzielte Wirkung wollen wir als „hypotonen Effekt“ bezeichnen.

Das Ausmaß der Hypotonie, das notwendig war, um die Kontraktionskraft zu vergrößern, ist abhängig vom Alter des Muskelpräparates, der individuellen Empfindlichkeit und der Art der Vorbehandlung (je

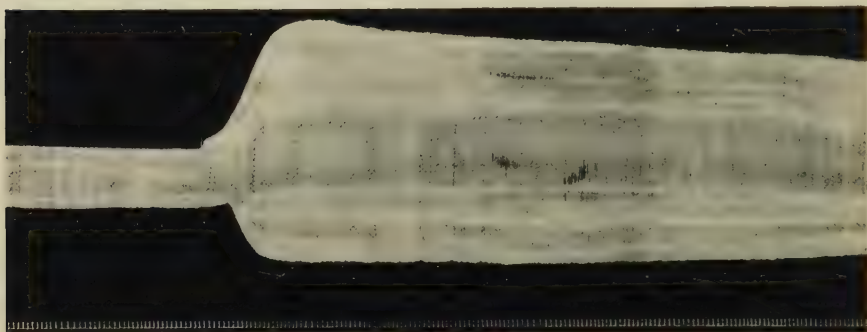


Abb. 1. Rattenzwerchfell; Reizung: direkt, supramaximal, Impulsdauer 2 msec, Frequenz 0,25 Hz. Registrierung halbisometrisch, Zeitschreibung 30 sec. Zwerchfell 1 Std in Tyrodelösung, darauf 4 Std in „6/10-Tyrode“, anschließend 2 Std in Tyrodelösung. ↑ = Ersatz der normalen Badflüssigkeit durch „6/10-Tyrode“.

häufiger die hypotone Lösung gegeben wurde, um so stärker trat der „hypotone Effekt“ in Erscheinung). Die Salzlösungen, die sich als besonders wirksam erwiesen, hatten einen Salzgehalt, der 6/10—5/10 der isotonen Tyrodelösung ausmachte (der Kürze halber „6/10-Tyrode“ bzw. allgemein „x/10-Tyrode“ genannt). Stärkere Verdünnungen, wie „4/10-Tyrode“ oder „3/10-Tyrode“, führten zu einem Tonusanstieg und waren somit zur Erzeugung des „hypotonen Effektes“ nicht geeignet. Weniger als 6/10 verdünnte Tyrodelösungen waren ebenfalls wirksam, jedoch erreichte die Zunahme der Kontraktionshöhe nach „8/10-Tyrode“ oder „7/10-Tyrode“ nicht diejenige der oben genannten Konzentrationen.

Zwerchfellpräparate, die erst kurze Zeit den Versuchsbedingungen unterworfen waren, zeigten auf hypotone Lösung keine oder eine unwesentliche Vergrößerung der Kontraktionen. Häufig konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt ein Auftreten von Fibrillationen und eine Verzögerung der Erschlaffung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen beobachtet werden. Dies geht auf eine Erniedrigung des absoluten Calciumgehaltes

in der „6/10-Tyrode“ zurück, denn Zusatz der „fehlenden Menge“ Calciumionen ließ diese Erscheinungen sistieren.

Bei Anwendung der beschriebenen Versuchsanordnung auf „chronisch-denervierte“ Zwerchfelle zeigten diese dasselbe Verhalten wie die normale Muskulatur. Auf „6/10-Tyrode“ stieg die Kontraktionshöhe an, blieb über lange Zeit gegenüber dem Wert vor Zusatz der hypotonen Lösung erhalten und ging auf erneuten Milieuwechsel wieder auf niedere Ausschlagshöhen zurück.

2. Beeinflussung des „hypotonen Effektes“.

Die „hypotone Tyrode“ wurde modifiziert, indem der osmotische Anteil, der der hypotonen Salzlösung an der Isotonie fehlt, durch Zugabe von Saccharose ersetzt wurde. Dadurch erhielten wir eine Badflüssig-



Abb. 2. Rattenzwerchfell. Technische Daten wie Abb. 1. Zwerchfell 5 Std im Versuch, Zustand nach drei „hypotonen Effekten“. 1 „6/10 Tyrode“; 2 „6/10-Tyrode“ mit Saccharose auf Warmblüterisotonie eingestellt; 3 „6/10-Tyrode“; ↓ 3 mal Auswaschen bei stehendem Kymographion.

keit, die warmblüterisoton ist und deren Gehalt an Ionen nur $x/10$ der Tyrodelösung ausmacht. Eine solche Lösung erzeugte im Gegensatz zur „6/10-Tyrode“ keinen „hypotonen Effekt“ (Abb. 2). Verminderung des ionalen Gehaltes der Badflüssigkeit bei Aufrechterhaltung der Isotonie durch eine indifferente Substanz löste also keine Vergrößerung der Zuckungshöhe aus.

Ebenso erhielten wir eine Abschwächung bzw. eine Aufhebung des „hypotonen Effektes“ durch Erhöhung des Calcium- oder Kaliumgehaltes in der „hypotonen Tyrode“. Dabei wurde die Vermehrung der Calcium- und Kaliumionen in der „ $x/10$ -Tyrode“ durchgeführt, indem für die zusätzlichen Ionen ein entsprechender Anteil an Natriumchlorid weggelassen wurde. Die durch den Bruch $x/10$ angegebene Hypotonie herrschte also tatsächlich. Steigerung der Calciumkonzentration in der „6/10-

Tyrode“ auf 100 mg% führte zu einer Abschwächung des „hypotonen Effektes“. Dabei muß erwähnt werden, daß die Vermehrung des Calciums auf die dieselbe Menge in der normalen Tyrodelösung einen unbedeutenden Einfluß auf die Zuckungshöhe des Muskels nahm. Ein ähnliches Verhalten zeigte das Kalium. Eine Vermehrung dieses Ions um das Vierfache („6/10-Tyrode“ mit 75 mg% KCl) unterdrückte den „hypotonen Effekt“, während in isotoner Lösung ein so erhöhter Kaliumgehalt zu keiner wesentlichen Reaktion Anlaß gab (Abb. 3). Verschiebung der ionalen Zusammensetzung der „hypotonen Tyrode“ durch Steigerung der Calcium- oder Kaliummenge hemmt also das Auftreten des „hypotonen Effektes“.

Wurde das Muskelbad statt mit reinem Sauerstoff mit 95% Sauerstoff + 5% Kohlensäure durchperlt, so ließ sich der „hypotone Effekt“

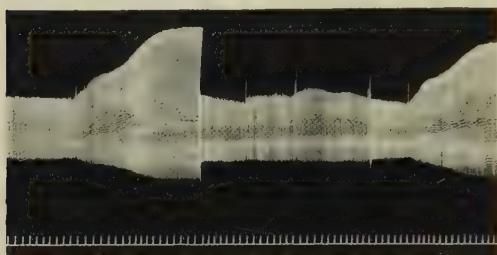


Abb. 3. Rattenzwerchfell. Technische Daten wie Abb. 1. Zwerchfell 10 Std im Versuch, davon 8 Std ungereizt bei Zimmertemperatur. Zustand nach vier „hypotonen Effekten“. 1 „6/10-Tyrode“; 2 Tyrodelösung mit 75 mg% KCl; 3 „6/10-Tyrode“ mit 75 mg% KCl; 4 „6/10-Tyrode“; ↓ 3 mal Auswaschen bei stehendem Kymographion.

nur sehr mangelhaft auslösen. Messung des pH-Wertes ergab ein Absinken von etwa 7,9 auf 7,1. Tyrodelösung, die durch Verdoppelung des Phosphat- und Verminderung des Bicarbonatanteiles auf ein Zehntel der normalen Menge auf einen niedrigen pH-Wert von etwa 6,7 eingestellt und mit reinem Sauerstoff durchströmt wurde, verminderte ebenfalls die Neigung des Zwerchfelles,

mit einer langdauernden Verbesserung der Muskelleistung auf die „hypotone Tyrode“ zu reagieren. Zusätzliche Durchperlung dieser „sauren Tyrodelösung“ mit 95% Sauerstoff + 5% Kohlensäure machte es unmöglich, den „hypotonen Effekt“ auszulösen.

3. Abhängigkeit des „hypotonen Effektes“ von der Badtemperatur.

Die bisher beschriebenen Versuche wurden bei einer Badtemperatur von 37° C durchgeführt. Die Senkung der Temperatur veränderte den „hypotonen Effekt“. Je tiefer die Versuchstemperatur unter der Körpertemperatur lag, um so langsamer und um so weniger ausgeprägt trat der „hypotone Effekt“ auf. Schon bei 25° C ist dieser Effekt nicht mehr auszulösen.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Durch hypotone Salzlösungen wird die Kontraktionskraft ermüdet oder mit hypotonen Lösungen vorbehandelter Rattenzwerchfelle heraufgesetzt. Das Ausmaß der Verbesserung ist abhängig von der während des

Versuches bereits erfolgten Abnahme der Hubhöhe, denn die Verbesserung ist im günstigsten Falle nur eine Wiederherstellung der am Beginn des Versuches gezeigten Kontraktionshöhe. Dabei kann der „hypotone Effekt“ ein bedeutendes Ausmaß annehmen wie folgendes Beispiel beweisen mag: In 15 Std hat die Hubhöhe eines Zwerchfelles um $\frac{4}{5}$ seiner anfänglichen Zuckungshöhe abgenommen; wird jetzt „6/10-Tyrode“ als Badflüssigkeit gegeben, so steigt die Hubhöhe wieder auf die zu Beginn des Versuches vorhandene an. Es findet somit eine 400%ige Zunahme der Hubhöhe statt. Unter gleichen Versuchsbedingungen sind die Verbesserungen, die wir mit Adrenalin oder Prostigmin in geeigneten Konzentrationen erzwingen konnten, sehr klein.

Der Einwand, der „hypotone Effekt“ könne durch Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit im Bade unter hypotoner Salzlösung zustande kommen — die Stromdichte wird unter diesen Bedingungen in der Muskulatur selbst größer —, kann durch folgendes ausgeschlossen werden: 1. es wurde supramaximal gereizt, 2. bei Zusatz von Saccharose, einem Nichtelektrolyten, unterblieb der „hypotone Effekt“, 3. Austausch von CaCl_2 oder KCl gegen NaCl bei konstant bleibender Anzahl von Ionen unterdrückte ebenfalls den „hypotonen Effekt“.

Verschiedene Faktoren müssen für die Auslösung des „hypotonen Effektes“ zusammentreffen, denn eine einzelne Deutungsmöglichkeit für sich besteht nicht, wie folgende Überlegungen zeigen:

1. Die Vergrößerung des Kaliumgradienten bei Zusatz der „hypotonen Tyrode“ zieht eine Zunahme des Membranpotential nach sich, da das Membranpotential linear vom Logarithmus des Kaliumgradienten abhängig ist (FLECKENSTEIN und HERTEL, LING und GERARD, HODGKIN). Bei Zusatz der „hypotonen Tyrode“ wird der Kaliumgradient durch Herabsetzung der extracellulären Kaliumkonzentration vergrößert. Gegen die Annahme, daß durch diesen Anstieg des Gradienten der „hypotone Effekt“ zu erklären sei, sprechen zwei Experimente: Eine „6/10-Tyrode“, die mit Saccharose wieder isoton gemacht ist, vermag den „hypotonen Effekt“ nicht auszulösen, und zweitens verursacht eine Verminderung des Kaliums in der normlean Tyrodelösung keine Verbesserung der Zuckungshöhe.

2. Durch die Verminderung des extracellulären Natriums während des „hypotonen Effektes“ findet eine Erleichterung des Natriumtransportes aus der Zelle heraus statt, wie kürzlich McDOWALL und ZAYAT zur Erklärung eines Effektes am Rattenherzmuskel ausführten. Aber auch gegen diese einfache Annahme lassen sich experimentelle Befunde anführen: Nach „Auffüllen“ der „hypotonen Tyrode“ mit Saccharose unterbleibt der „hypotone Effekt“, ebenso wie er durch Änderung der ionalen Zusammensetzung der „6/10-Tyrode“ (Vermehrung des Kaliums) unterdrückt werden kann.

3. Die Abhängigkeit des „hypotonen Effektes“ von der Konzentration der Bicarbonationen könnte nach Befunden von CREESE gedeutet werden. Mangel an Bicarbonationen — in unseren Versuchen Durchströmung mit reinem Sauerstoff — führt zum Absinken des intracellulären Kaliumgehaltes, damit zur Abnahme der Hubhöhe. Während eines solchen Zustandes könnte die Zunahme des Kaliumgradienten durch Gabe „hypotoner Tyrode“ eine Verbesserung der muskulären Leistung veranlassen. Die alleinige Ursache für den „hypotonen Effekt“ kann aber auch hierin nicht gesucht werden.

4. Die Verminderung des osmotischen Druckes im extracellulären Raum kann als einzige Ursache für den „hypotonen Effekt“ ebenfalls ausgeschlossen werden, denn Erhöhung des Kalium und Calciumgehaltes bei Konstanz der „6/10-Hypotonie“ läßt den „hypotonen Effekt“ nicht entstehen.

Die Temperaturabhängigkeit, die der „hypotone Effekt“ aufweist, gestattet es nicht, Aussagen über die Entstehung dieses Effektes zu machen.

Falls eine „Membranwirkung“ der „hypotonen Tyrode“ angenommen werden soll, muß es sich sicher um ein komplexes Geschehen handeln, denn soweit wir die einfachen Möglichkeiten übersehen, kann hier jede einzelne experimentell als nicht genügend umfassend abgelehnt werden. Außerdem müssen weitere Angriffspunkte für die ionalen Veränderungen, die den „hypotonen Effekt“ verursachen, in Betracht gezogen werden, nämlich der Stoffwechsel der Muskelzellen und die kontraktile Proteine.

Zusammenfassung.

Es wird die Wirkung hypotoner Salzlösungen auf das isolierte Rattenzwerchfell beschrieben. Auf $\frac{5}{10}$ — $\frac{6}{10}$ der Isotonie verdünnte Tyrodelösungen führen an Muskeln, die bereits längere Zeit im Versuch sind, zu einer dauernden Verstärkung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen („hypotoner Effekt“). Mit Saccharose auf Warmblüterisotonie ergänzte hypotone Salzlösungen zeigen diesen Effekt nicht. Vermehrung des Kaliums oder Calciums im Austausch gegen Natrium bei erhaltener Hypotonie hemmt den „hypotonen Effekt“, Senkung der Badetemperatur hebt ihn ebenfalls auf.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur.

BÜLBRING, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — CREESE, R.: Biochemic. J. **50**, XVIII (1952). — FLECKENSTEIN, A., u. H. HERTEL: Pflügers Arch. **250**, 577 (1948). — HODGKIN, A. L.: Biol. Rev. Cambridge **26**, 339 (1951). — LING, G., and R. W. GERARD: Nature (Lond.) **165**, 113 (1950). — LÜLLMANN, H., W. FÖRSTER u. E. WESTERMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 8 (1952). — McDOWALL, R. J. S., and A. F. ZAYAT: J. of Physiol. **120**, 13 P (1953).

Dr. HEINZ LÜLLMANN, Pharmakologisches Institut der Universität Mainz.

Aus der Medizinischen Klinik der ehemaligen Taihoku Universität (gegenwärtig Chinesische Nationale Taiwan Universität) und der Medizinischen Klinik der Universität Niigata, Japan.

Pharmakologische Untersuchungen über Hinokitiol (m-Isopropyltropolon).

Von

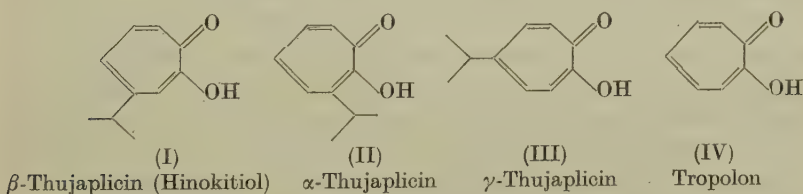
SHIGEHIRO KATSURA.

(Eingegangen am 26. September 1953.)

Die Untersuchungen wurden an der Taihoku Universität (gegenwärtig Chinesische Nationale Taiwan Universität) angefangen, und der erste Bericht über die antibakterielle Wirkung wurde am 3. April 1940 auf der Tagung der japanischen Tuberkulose-Gesellschaft erstattet. Was die pharmakologischen Untersuchungen von Hinokitiol (Hi) bzw. Hinokitiol-Natrium (Hi-Na) betrifft, so hat SHU-YU LEE, eine Schülerin des Verfassers, unter Leitung von Prof. CHEN-YUAN LEE Versuche angestellt und zuerst beim 41. Kongreß (November 1948) der medizinischen Gesellschaft in Taiwan darüber vorgetragen. Ausführliche Berichte von LEE sind in Niigata Med. J. erschienen, aber bisher in keiner Form in europäischen Sprachen. Da die Arbeit demnach in diesen Sprachkreisen ganz unbekannt bleiben würde, so erlaube ich mir unter Genehmigung von Herrn Prof. CHEN-YUAN LEE und Frau Dr. SHU-YU LEE darüber hier kurz zu berichten.

T. NOZOE hat im Jahre 1936 berichtet, daß er im ätherischen Öl des Taiwanhinoki (*Chamaecyparis taiwanensis* Masamune et S. Suzuki) eine charakteristische Substanz gefunden und ihr den Namen Hinokitiol gegeben hatte. Anfangs nahm er an, daß diese Substanz die Formel $C_{12}H_{14}O_2$ hätte und ihre Struktur Isopropyl-cycloheptadienolon sei. Nach den weiteren Untersuchungen von ihm und seinen Mitarbeitern (1944, 1950) hat Hinokitiol die Formel $C_{10}H_{12}O_2$ und die folgende Struktur (I), d. h. 4-Isopropyl-cycloheptatrien-2,4,6-ol-2-on-1 oder m-Isopropyltropolon.

Struktur von β -, α - u. γ -Thujaplicin und Tropolon.



Die reine Substanz besteht aus fast farblosen Kristallen mit dem Schmelzpunkt von 52°C . Sie bildet sehr leicht Komplexsalze mit zwei- oder dreiwertigen Metallen; z. B. verbindet sie sich mit Ferrichlorid zu

einem dunkelrötlichen Komplexsalz, das von NOZOE Hinokitin genannt wurde.

Unabhängig von NOZOE haben 1948 ERDTMAN, ANDERSON u. GRIPENBERG berichtet, daß sie aus dem Holz von Thuja plicata Don α -Thujaplicin (II), β -Thujaplicin (I) und γ -Thujaplicin (III) dargestellt hatten. Die Mischprobe von Hinokitiol und β -Thujaplicin hat ergeben, daß die beiden Produkte eine und dieselbe Substanz sind.

DEWAR hat 1945 angenommen, daß Stipitaminsäure und Colchicin als einheitliches Strukturelement Cycloheptatrienol enthalten, und er hat dieser Muttersubstanz den Namen Tropolon gegeben. Die Synthese des Tropolons ($C_7H_6O_2$, IV) ist von ENDE (1949), zu Anfang 1950 fast gleichzeitig NOZOE u. a., DOERING u. a., COOK u. a. und HAWORTH u. a. gelungen. Auch α -, β - und γ -Thujaplicin sind von NOZOE u. a. (1950c, d; 1951) und COOK u. a. (1901) synthetisch dargestellt worden.

Verfasser und seine Mitarbeiter beschäftigen sich seit langem mit dem Studium der medizinischen Anwendung des Hinokitiols (erster Bericht 3. April 1940). Hier soll hauptsächlich über die Resultate der pharmakologischen Untersuchungen von Hinokitiol (Hi) bzw. Hinokitiol-Natrium (Hi-Na) berichtet werden.

1. Allgemeine und lokale Wirkungen und Letaldose des Hi.

Als Versuchstiere wurden der Frosch von Formosa (*Rana tigerina*), Maus, Meerschweinchen und Kaninchen benutzt. Lösung von Hi in Sesamöl oder Hi-Na in physiologischer Kochsalzlösung wurde in den Lymphsack des Frosches, bei Maus und Meerschweinchen subcutan gespritzt. Bei Kaninchen wurde Hi-Na-Lösung intravenös gespritzt. Beim Frosch tritt durch wirksame Dosen (0,05—0,5 mg/g) von Anfang an eine zentrale, absteigende Lähmung auf. Kleine Dosen wie 0,1 mg/g bei der Maus, 0,5 g/kg beim Meerschweinchen oder 0,01 g/kg beim Kaninchen rufen nur unbedeutende Erscheinungen wie depressive Zustände und Veränderung der Atemfrequenz hervor. Große Dosen (1 mg/g bei der Maus, 5 g/kg beim Meerschweinchen und 0,1 g/kg beim Kaninchen) bewirken zuerst tonisch-klonische Krämpfe und später Tod unter allgemeiner Lähmung. Noch größere Dosen verursachen meist sofort einen schockartigen Tod. Die LD_{50} (nach der Methode von VAN DER WAERDEN) ist beim Frosch $0,163 \pm 0,11$ mg/g für Hi, und $0,201 \pm 0,014$ mg/g für Hi-Na. Bei der Maus ist sie $0,395 \pm 0,045$ mg/g für Hi und $0,453 \pm 0,026$ mg/g für Hi-Na. Hier liegen also die beiden Dosen gut im Verhältnis der Molekulargewichte. Die Minimalletaldose war beim Meerschweinchen für Hi 1,0 g/kg und für Hi-Na 0,5—1,0 g/kg (subcutan), beim Kaninchen 0,1 g/kg (intravenös).

Lokal ruft die 0,5%ige Hi- bzw. Hi-Na-Lösung, wenn sie auf die Bindehaut des Kaninchen geträufelt wird, eine vorübergehende Hyperämie und lokales Ödem hervor, die 5- und 10%ige Lösung eine schwere Conjunctivitis mit Erosionen. Bei subcutaner Einspritzung einer 25%igen Hi-Öllösung entsteht (nach HIRADO) beim Meerschweinchen eine lokale Nekrose.

2. Wirkung des Hi auf die Atmung und den Blutdruck.

Bei Meerschweinchen verursacht subcutane Injektion von 0,1 g/kg Hi keine Veränderung der Atmung oder des Blutdrucks. Mehr als 0,5 g/kg Hi ruft meistens Verminderung der Atem- und Herzfrequenz sowie Abfall des Blutdrucks hervor, so daß binnen 3—8 Std die Atmung still steht und der Blutdruck auf Null sinkt. Da solche Erscheinungen auch nach doppelseitiger Vagusdurchschneidung oder Vorbehandlung mit Atropin beobachtet werden, ist diese Wirkung des Hi vom Vaguszentrum und vom peripheren Parasympathicus unabhängig. Wenn bei Kaninchen 0,05 bis 0,1 g/kg Hi-Na intravenös eingespritzt wird, so treten nach etwa 16 Std dieselben Erscheinungen wie bei Meerschweinchen auf; sie sterben dann binnen 24 Std. Intravenöse Injektion von 0,2 g/kg Hi-Na bewirkt (am Kaninchen) sofort Atemstillstand und Blutdruckabfall bis Null.

3. Wirkung des Hi auf das Herz und die Blutgefäße.

Bei der Durchströmung des ausgeschnittenen Froschherzens nach STRAUB hat sich ergeben, daß Dosen von 0,00005—0,0001% Hi-Na die Systole des Froschherzens verstärken, von 0,001—0,01% sie anfangs verstärken, doch später verkleinern, wobei auch die Schlagzahl sinkt. 0,05—0,1% wirken von Anfang an lähmend und führen zu diastolischem Stillstand. Der Angriffspunkt des Hi scheint im Herzmuskel selbst zu liegen, da die lähmende Wirkung durch Ergotoxin, Atropin und Chloralhydrat nicht verhindert wird. Auf das isolierte Kaninchenherz wirkt Hi-Na in der Dose von 0,0001—0,001% für kurze Zeit erregend, später lähmend. 0,001% bewirkt nach 30 min diastolischen Stillstand. Diese lähmende Wirkung wird durch Zusatz von Blut in hohem Grade abgeschwächt. An Gefäßpräparaten (sowohl Hinterextremitäten vom Frosch wie Ohrmuscheln vom Kaninchen) zeigt sich nach Dosen von 0,0001—0,01% bzw. 0,0005—0,001% Kontraktion, aber auch diese Wirkung wird durch Zusatz von Blut vermindert oder verhindert.

4. Wirkung des Hi auf die Darmmuskulatur des Kaninchens.

Auf die isolierte Dünndarmmuskulatur des Kaninchens hat 0,0001 bis 0,0005% ige Hi-Na-Lösung keine Wirkung. 0,005% setzt den Tonus der Darmmuskulatur und die Amplitude der Bewegungen bis auf $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ herab, deren Zahl ebenfalls abnimmt. Der Angriffspunkt von Hi-Na muß in der Darmmuskulatur selbst liegen, da die Erscheinungen durch Pilocarpin, Atropin oder Adrenalin nicht beeinflußt werden, wohl aber durch BaCl_2 .

5. Wirkung des Hi auf die Muskulatur des Kaninchenuterus.

0,0001—0,001% ige Hi-Na-Lösung war ohne Wirkung, 0,001—0,01% ruft Erregung, 0,05—0,1% Lähmung hervor. Der Angriffspunkt scheint ebenfalls in der Uterusmuskulatur selbst zu liegen.

6. *Wirkung des Hi auf Skelettmuskeln und periphere Nerven des Frosches.*

Hi-Na wirkt auf den Skelettmuskel des Frosches bei der minimal wirk-samen Dose (0,005%) von Anfang an lähmend. Es greift die Muskulatur und die peripheren motorischen Nervenendigungen an. Auch sensible periphere Nervenfasern werden durch Hi-Na gelähmt.

Außer diesen Ergebnissen nach LEE und teilweise nach HIRADO bliebe zu erwähnen, daß FUTAMURA die abtötende Wirkung von Hi-Na auf Paramaecium stärker gefunden hat als die von Chinium oder Emetinum hydrochloricum. AOKI untersuchte verschiedene Tropolonverbindungen pharmakologisch. Nach ERDTMAN, ANDERSON und GRIPENBERG ist β -Thujaplicin ein Gift für Fische. Exemplare von *Labistes reticulatus* starben in 0,002% iger Lösung dieser Substanz binnen 3 Std.

Zusammenfassung.

Die allgemeine Wirkung des Hinokitiols ist von Anfang an lähmend, an Nagern in kleinen Dosen erregend, selbst krampferzeugend und in großen Dosen lähmend. Auf das Herz und die Uterusmuskulatur des Kaninchens verstärkt es in kleinen Dosen die Kontraktion und lähmt sie in großen Dosen. Die Muskulatur des Kaninchendarms wird von Anfang an gehemmt. Der Angriffspunkt scheint im Muskel selbst zu liegen. Ferner bewirkt Hi Vasokonstriktion, Lähmung des isolierten Froschmuskels und lokale Reizung. Nach alledem ist es ein Nervmuskelgift, das in mancher Hin-sicht dem Campher, Thujon und anderen Terpenverbindungen nahesteht.

Literatur.

AOKI, M.: *Fol. Pharmacol. Japonica* **46**, 184 (1950). — COOK, J. W., and A. R. GIBB: *Chem. a. Ind.* **1950**, 427. — COOK, J. W., A. R. GIBB, R. A. RHAPHAEL and A. R. SOMMERVILLE: *J. Chem. Soc.* **503**, 695 (1951). — DEWAR, M. J. S.: *Nature (Lond.)* **155**, 141 (1945). — *Chem. Abstr.* **39**, 2067 (1945). — DOERING, W. E., and L. H. KNOX: *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2305 (1950). — ERDTMAN, H., and J. GRIPENBERG: *Nature (Lond.)* **161**, 719 (1948). — ERDTMAN, H., A. B. ANDERSON u. J. GRIPENBERG: *Acta Chim. Scand.* **2**, 625, 639, 644 (1948). — FUTAMURA, H.: *Fol. Pharmacol. Japonica* **46**, 112 (1950). — HAWORTH, R. D., and J. D. HOBSON: *Chem. a. Ind.* **1950**, 441. — HIRADO, Y.: *Kumamoto Med. J.* **23**, 260 (1949). — KATSURA, S., u. a.: *Kekkaku (Tuberculosis)* **18**, 1238 (1940). — LEE, S. Y.: *Niigata Med. J.* **65**, Nr. 8, 9 u. 11, 566, 633, 739 (1951). — NOZOE, T.: *Bull. Chem. Soc. Japan* **11**, 295 (1936). — *Science of Drugs (Sammelrefreat auf japanisch)* **3**, 174 (1949); Englische Übersetzung: *Sci. Rep. of Tohoku Univ.* **34**, 199 (1950). — NOZOE, T., and S. KATSURA: *J. Pharmaceut. Soc. Japan* **64**, 181 (1944). — NOZOE, T., S. SETO, Y. KITAHARA, M. KUNORI and Y. NAKAYAMA: *Proc. Jap. Acad.* **26**, Nr. 7, 38 (1950). — NOZOE, T., S. SETO, K. KIKUCHI, T. MUKAI, S. MATSUMOTO and M. MURASE: *Proc. Japan Acad.* **26**, Nr. 7, 43 (1950). — NOZOE, T., Y. KITAHARA and S. ITO: *Proc. Japan Acad.* **26**, Nr. 7, 47 (1950). — NOZOE, T., A. YASUE and K. YAMANE: *Proc. Japan Acad.* **27**, Nr. 1, 15 (1951). — NOZOE, T., S. SETO, K. KIKUCHI and H. TAKEDA: *Proc. Japan Acad.* **27**, Nr. 3, 146 (1951). — VAN DER WAERDEN, B. L.: *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol.* **195**, 389 (1940).

Prof. Dr. SHIGEHIRO KATSURA, Niigata, Japan, Medizinische Klinik der Universität.

Aus der Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. H. BOHN) der Akademie für Medizinische Forschung und Fortbildung der Justus-Liebig-Hochschule zu Gießen.

Der Einfluß von Desoxycorticosteron auf den Glykogeengehalt der Leber bei weißen Ratten*.

Von

N. KELLER und G. LINDEN.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 6. September 1953.)

Der Zusammenhang zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und Nebennierenrindenhormonen ist bereits mehrfach untersucht worden. Man hat sich besonders der Frage zugewendet, ob das Desoxycorticosteronacetat (DOCA) außer seinen Wirkungen auf den Wasser- und Salzhaushalt auch direkt den Kohlenhydratstoffwechsel des Körpers beeinflusst (DEUEL 1937, KENDALL 1945, OBERDISSE und HERING 1948, HAUSBERGER 1949, VERZAR 1950, SWINGLE u. Mitarb. 1951, VERZAR und SAILER 1952).

Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Beurteilung dieser Frage ist sicher die Zeit, die zwischen Adrenalektomie und Untersuchung des Leberglykogens verstrichen ist. So beobachteten z. B. KENDALL u. Mitarb. (1945) an Ratten 6 Std nach Adrenalektomie keine Beeinflussung des Leberglykogenspiegels durch DOCA. WIDSTRÖM, der 10 Tage nach der Adrenalektomie untersuchte, erhielt dagegen bei den mit DOCA behandelten Ratten nach dieser Zeit auf Glucosegabe denselben Glykogenspiegel wie bei Normaltieren. DEUEL u. Mitarb. stellten an adrenalektomierten Ratten, die sie 12—20 Tage nur durch Kochsalzzugabe zur Nahrung am Leben erhalten hatten, fest, daß nach Glucosegabe derselbe Glykogenanstieg wie bei Normaltieren bei adrenalektomierten Ratten nur dann zu erwarten ist, wenn der Salzhaushalt der Tiere durch Kochsalzzufuhr möglichst weitgehend den physiologischen Verhältnissen entspricht. Ist aber demnach nicht diese Normalisierung des Salzhaushaltes eine wesentliche Voraussetzung für die Glykogenspeicherung?

Nach Adrenalektomie geht die Fähigkeit, Natrium, Kalium und Wasser in normaler Weise im Körper zu verteilen, weitgehend verloren. Sowohl durch Verabreichung von Kochsalz als auch durch kaliumarme Diät läßt sich der Zustand der Tiere verbessern. Es müßten sich somit auch die Glykogenaufbauprozesse, die ja eng mit dem Kalium- (HAUSBERGER,

* Die Durchführung der Arbeit wurde ermöglicht durch Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.

KENDALL 1941, 1952, VERZÄR 1941, 1942) und vermutlich auch mit dem Natriumstoffwechsel gekoppelt sind, durch Salzzufuhr steigern lassen.

Nachdem über diese Frage immer noch Unklarheiten bestehen, haben wir das Problem erneut aufgegriffen. Wir haben an adrenalektomierten Tieren neben der DOCA-Wirkung besonders den Einfluß des Kochsalzes und des Hungerzustandes auf die Glykogenbildung untersucht, unter besonderer Berücksichtigung des Zeitfaktors. Die Untersuchungen wurden an 8 verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt. Die Einzelheiten sind im Abschnitt Methodik dargestellt.

Methodik.

Die Tiere wurden aufgeteilt in 8 Versuchsreihen (A—H), die sich in 3 Hauptgruppen zusammenfassen lassen. Der Leberglykogengehalt wurde bestimmt bei:

A. Normaltieren, d. h. bei nicht adrenalektomierten Ratten.

I. 4-Tages-Versuche.

B. Adrenalektomierte, kochsalzfrei ernährte Ratten.

C. Adrenalektomierte Ratten bei kochsalzhaltiger Fütterung.

D. Adrenalektomierte, kochsalzfrei ernährte Ratten unter DOCA-Behandlung.

II. Eintages-Versuche.

E. Adrenalektomierte Ratten, kochsalzhaltige Fütterung.

F. Adrenalektomierte Ratten, kochsalzfreie Ernährung + DOCA-Behandlung.

III. Hungerversuche.

G. Adrenalektomierte Ratten bei kochsalzhaltiger Fütterung. 4-tägiger Versuch, der 4. Tag als Hungertag.

H. Adrenalektomierte, kochsalzfrei ernährte Ratten unter DOCA-Behandlung, 4-tägiger Versuch, der 4. Tag als Hungertag.

1. Die Tierversuche.

a) *Tiermaterial.* Als Versuchstiere dienten männliche weiße Ratten mit einem Gewicht von 70—110 g. Die Tiere waren käuflich erworben. Für die Versuche wurden diese kleinen Tiere gewählt, da bei älteren eher funktionstüchtige, accessorische Nebennieren zu erwarten waren. Während der Versuchsdauer wurden die Ratten in Einzelkäfigen gehalten.

b) *Die Nahrung* wurde den Tieren immer reichlich angeboten. Um die Tageschwankungen des Leberglykogenspiegels möglichst auszuschalten, wurden die Ratten stets zur gleichen Tageszeit getötet (HAAS). Die Normaltiere (Gruppe A) wurden mit gewöhnlichem Weißbrot und Haferkörnern (Normalkost) ernährt. Dazu bekamen sie Leitungswasser zu trinken. Die adrenalektomierten Ratten der Gruppen B—H wurden folgendermaßen gefüttert: Die Tiere der Gruppe B (Kontrolltiere) D, F, H (DOCA-behandelte Tiere) wurden kochsalzfrei ernährt. Es wurde ihnen das in der Klinik an Nephritiker abgegebene kochsalzfreie Weißbrot, dazu Haferkörner verfüttert; als Trinkwasser bekamen sie Leitungswasser. Die Gruppen C, E und G, bei denen die Wirkung des Kochsalzes untersucht werden sollte, erhielten Normalkost und zum Trinken physiologische Kochsalzlösung.

c) *Die Operation.* Die Nebennieren wurden in der von VERZÄR beschriebenen Weise exstirpiert. Es wurde besonders darauf geachtet, daß die Nebennieren mitsamt ihrem Fettpolster entfernt wurden, da sich darin öfters accessorische Drüsen finden.

d) *Die Injektionen.* Um eine möglichst rasche Resorption des in Öl gelösten DOCA zu gewährleisten, injizierten wir intraperitoneal und zwar, wie VERZÄR, täglich 2 mg DOCA (Percorten Ciba). Die erste Injektion erfolgte jeweils sofort nach der Adrenalectomie. Um bei den kurzfristigen 24 Std-Versuchen eindeutige Verhältnisse zu haben, wurde diesen Tieren das Kochsalz nicht nur im Trinkwasser vorgesetzt (Gruppe E), sondern es wurde sofort nach der Operation einmalig 1 ml physiologische Kochsalzlösung subcutan über dem Sternum injiziert.

e) *Die Tötung der Tiere.* Durch einen Schlag auf den Kopf wurden die Ratten betäubt und durch einen Scherenschlag dekapitiert. Anschließend wurde rasch die Bauchhöhle eröffnet und zur völligen Ausblutung das rechte Herz aufgeschnitten.

2. Die Glykogenaufarbeitung.

Zur Glykogenbestimmung wurde immer der linke, große Leberlappen verwendet, um Fehler durch einen eventuellen Unterschied im Glykogengehalt der Lappen zu vermeiden. Etwa 2 min nach der Dekapitation wurde ein Stückchen Leber abgeschnitten, zur Doppelbestimmung symmetrisch geteilt, jeder Teil auf einer Torsionswaage gewogen und jeweils sofort in ein Reagensglas gebracht, das 2 ml 40%ige Natronlauge enthält. In der Natronlauge wurden die Leberstückchen, die ein Gewicht von 300–500 mg besaßen, mit einem Glasstab fein zerrieben. Die weitere Aufarbeitung des Glykogens erfolgte nach der von VERZÄR und WENNER angegebenen Methode.

3. Die Glykogenbestimmung.

Die quantitative Bestimmung des Glykogens erfolgte nach hydrolytischer Spaltung zu Glucose mit Hilfe der Methode nach HAGEDORN-JENSEN (nach HALLMANN, L., u. P. RONA¹). *Der Glykogengehalt wird daher angegeben in Prozent Glucose, bezogen auf 100 g Leber-Feuchtgewicht.*

4. Die statistische Auswertung.

Die Ergebnisse werden nach dem t-Test von FISHER ausgewertet. Die Differenz der Mittelwerte zwischen Gruppe B (kochsalzfrei behandelt) und Gruppe C (kochsalzbehandelt) ließ sich sichern für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 5\%$, alle anderen Differenzen der Mittelwerte für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 2\%$. Weiterhin prüften wir unsere Ergebnisse mit den statistischen Tafeln von P. H. SUKHATME (Significance of Difference between two means, Table V_1 aus FISHER u. YATES). Auch nach diesem Test erwiesen sich die entsprechenden Differenzen der Mittelwerte als signifikant.

Die Ergebnisse der Untersuchungen.

Wir untersuchten den Leberglykogengehalt bei 79 Ratten im Gewicht von 70–110 g in 8 Versuchsgruppen (A–H) mit insgesamt 158 Doppelbestimmungen.

Obwohl wir die Tiere reichlich mit Futter versorgt hatten, wiesen die Einzelwerte bei unseren Versuchen in allen Gruppen erhebliche Unterschiede auf. Diese starken Schwankungen des Glykogengehaltes der Leber von Tier zu Tier wurde auch von anderen Autoren beobachtet (EGER und OTTENSMEIER, VERZÄR). Die Mehrzahl der Werte in den einzelnen Versuchsreihen liegen aber doch so, daß schon bei oberfläch-

¹ Einzelheiten siehe Dissertation G. LINDEN, Gießen 1953.

licher Betrachtung zu erkennen ist, ob im Mittel ein höherer oder tieferer Wert resultiert, und die statistische Auswertung ergab, daß die zum Vergleich kommenden Differenzen der Mittelwerte signifikant sind.

Die Ergebnisse sind in dem Diagramm zusammengestellt:

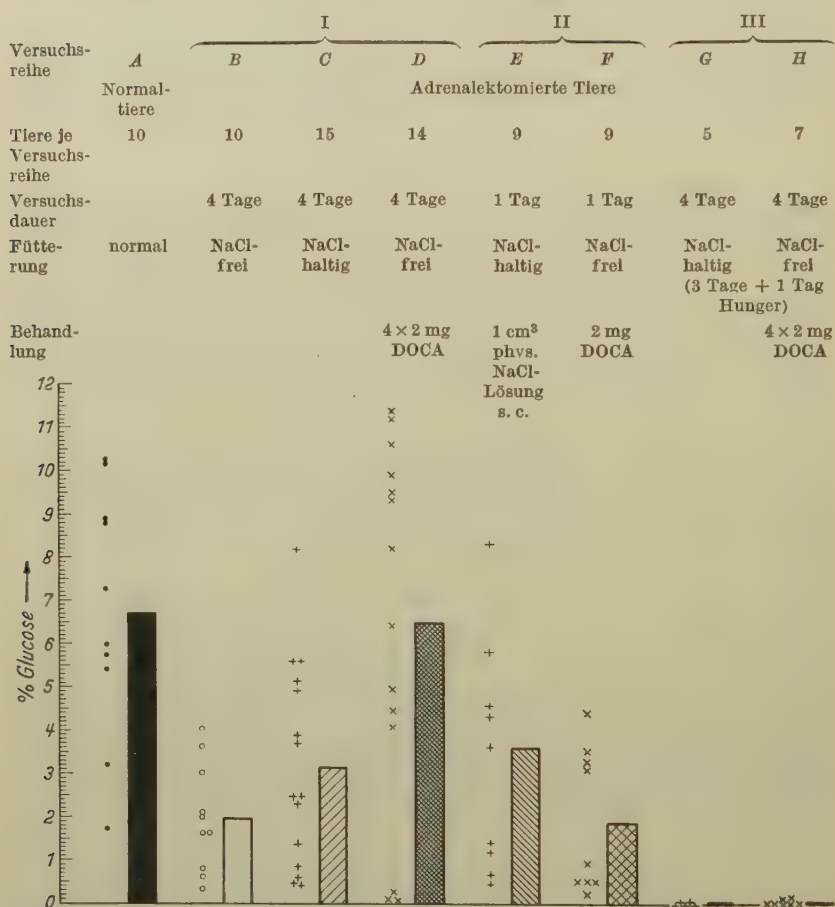


Abb. 1. Glykogengehalt der Leber. Die Einzelwerte sind mit Punkten, Kreisen und Kreuzen dargestellt und als Prozent Glucose angegeben. Die Säulen stellen den Mittelwert der jeweiligen Versuchsgruppe dar.

Gruppe A. Normaltiere.

10 Normaltiere (unbehandelt). Fütterung: Normalkost, Leitungswasser. Der Mittelwert des Glykogens betrug

$$\bar{x} = 6,71\% \text{ Glucose.}$$

Die mittlere Abweichung des Mittelwertes betrug

$$m = \pm 0,62\% \text{ Glucose.}$$

*I. 4-Tages-Versuche.**Gruppe B.*

10 Tiere, adrenalectomiert, 4-Tages-Versuch, kochsalzfrei ernährt. Die Tiere fraßen kaum und waren fast völlig adynamisch. Der Mittelwert des Leberglykogens betrug

$$x = 1,97\% \text{ Glucose} \pm 0,28\%.$$

Gruppe C.

15 Tiere, adrenalectomiert, 4-Tages-Versuch. Normalkost, als Trinkwasser physiologische Kochsalzlösung. Die Tiere bewegten sich im Vergleich mit denen der Gruppe B lebhafter und zeigten vermehrte Freßlust. Der Mittelwert des Leberglykogens war mit

$$x = 3,17\% \text{ Glucose} \pm 0,42\%$$

gegenüber der Gruppe B deutlich erhöht.

Gruppe D.

14 Tiere, adrenalectomiert, 4-Tages-Versuch. Die Tiere erhielten bei kochsalzfreier Ernährung täglich eine Injektion von 2 mg DOCA intraperitoneal. Die Ratten unterschieden sich vom 2. Tage an klinisch nicht von den Normaltieren, mit Ausnahme von 3 Tieren, die nicht recht fressen wollten und träger waren als die anderen. Ihre Obduktion ergab makroskopisch keine Besonderheiten. Der Leberglykogengehalt dieser 3 Tiere war trotz DOCA-Gabe sehr niedrig. Der Mittelwert des Leberglykogens erreicht bei Auswertung der gesamten Versuchsgruppe trotzdem mit

$$x = 6,44\% \text{ Glucose} \pm 0,77\%$$

praktisch den Wert der Normaltiere.

Ergebnis.

Die 4-Tages-Versuche ergaben, daß der Leberglykogenspiegel bei kochsalzfreier Ernährung stark absinkt, bei DOCA-Behandlung dem der Normaltiere gleichkommt. Aber auch die alleinige NaCl-Behandlung läßt einen deutlichen Glykogenanstieg erkennen.

*II. Eintagesversuche.**Gruppe E.*

9 Tiere, adrenalectomiert, Eintages-Versuch. Die Tiere erhielten Normalkost, als Trinkwasser physiologische Kochsalzlösung, dazu, wie oben näher ausgeführt, sofort nach der Operation eine subcutane Injektion von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Hierbei fiel auf, daß die Tiere unmittelbar nach der Injektion eine Lebhaftigkeit zeigten, wie wenn überhaupt kein Eingriff erfolgt wäre und im Verlauf des Tages war eine bessere Freßlust zu beobachten als bei den Tieren der Gruppe C am

1. Versuchstage, denen Kochsalz nur im Trinkwasser zugeführt worden war. Der nach 24 Std ermittelte Glykogenwert betrug

$$x = 3,63\% \text{ Glucose} \pm 0,58\% .$$

Der Glykogenwert war somit nach 24 Std etwas höher als bei den kochsalzbehandelten Tieren der Gruppe C nach 4 Tagen.

Gruppe F.

9 Tiere, adrenaletomiert, Eintages-Versuch. Zum Vergleich mit Gruppe E ernährten wir diese Tiere kochsalzfrei, injizierten aber sofort nach der Operation 2 mg DOCA intraperitoneal. Klinisch unterschieden sich die Tiere von denen der Gruppe E dadurch, daß sie sich langsamer von dem Operationsschock erholten. Nach 24 Std war ihr Verhalten etwa gleich dem der mit Kochsalz behandelten Tiere. Trotzdem betrug der Mittelwert des Leberglykogens nur

$$x = 1,87\% \text{ Glucose} \pm 0,48\% .$$

Ergebnis.

Die Eintages-Versuche ergaben einen relativ hohen Glucosegehalt bei Kochsalzgabe und einen stark erniedrigten Glucosewert bei DOCA-Behandlung.

III. Hungerversuche.

Gruppe G.

5 Tiere, adrenaletomiert, 4-Tages-Versuch, *am 4. Tag hungern*. Die Tiere erhielten Normalkost, als Trinkwasser physiologische Kochsalzlösung. Sie wurden also in den ersten 3 Versuchstagen gleich behandelt wie die Tiere der Gruppe C, mit denen sie auch in ihrem klinischen Befinden in diesen Tagen vergleichbar waren. Am Hungertage wurde das Befinden der Tiere sehr schlecht. Sie waren teilnahmslos und bewegten sich kaum. Der Mittelwert des Leberglykogens betrug $x = 0,06\% \text{ Glucose}$.

Gruppe H.

7 Tiere, adrenaletomiert, 4-Tages-Versuch, *am 4. Tage hungern*. Zum Unterschied von der Gruppe G wurden die Tiere in den ersten 3 Tagen kochsalzfrei ernährt und bekamen 4 Tage lang täglich 2 mg DOCA intraperitoneal. Sie waren in ihrem klinischen Befinden während der ersten 3 Tage mit den ebenfalls DOCA-behandelten Tieren der Gruppe D vergleichbar. Im Verlauf des 4. Tages wurden sie allmählich träger und unterschieden sich kurz vor der Dekapitation nicht mehr von den mit Kochsalz behandelten Tieren der Gruppe G. Der Mittelwert des Glykogens betrug

$$x = 0,07\% \text{ Glucose} .$$

Eine Angabe der Abweichung des Mittelwertes m erfolgt hier, wie bei der Gruppe G nicht, da sich die Einzelwerte an der Fehlergrenze der Bestimmungsmethode befinden.

Ergebnis.

Die Hungerversuche zeigten, daß weder DOCA noch Kochsalz imstande ist, den Glykogenschwund aufzuhalten.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei den *Viertagesversuchen* sank der Glykogenwert bei den unbehandelten, kochsalzfrei ernährten Tieren (Gruppe B) stark ab. Dies ist auf die bekannten Störungen nach Adrenalektomie zurückzuführen, die sich klinisch in schlechtem Allgemeinzustand und Freßunlust zeigen und deren hervorstechendste Folge die Abnahme der Glykogenie bzw. das rasche Schwinden der Glykogen-Reserven darstellen. Schon nach alleiniger Zufuhr von Kochsalz mit der Nahrung (Gruppe C) läßt sich eine bedeutende Besserung im klinischen Erscheinungsbild der Tiere und ein eindeutiger Anstieg des Leberglykogens feststellen. Durch die Kochsalzzufuhr scheinen einige der wesentlichen Stoffwechselfunktionen normalisiert zu werden, was sich unter anderem darin zeigt, daß man adrenaletomierte Ratten mit Kochsalz viele Wochen am Leben erhalten kann. Eine noch weitgehendere Normalisierung des Stoffwechsels erreicht man mit DOCA, wobei man wiederum den Glykogengehalt der Leber als Maßstab annehmen kann. Der Leberglykogenspiegel kommt bei den adrenaletomierten, DOCA-behandelten Tieren (Gruppe D) 4 Tage nach der Operation dem der Normaltiere praktisch gleich. Auch klinisch unterscheiden sich die meisten Tiere der Gruppe D nach 4tägiger DOCA-Behandlung nicht von den Normaltieren. Auffallend war jedoch, daß bei 3 Tieren ohne ersichtlichen Grund trotz DOCA-Gaben keinerlei Glykogenanstieg erfolgte.

Bei den *Eintagesversuchen* war bemerkenswert, daß nach subcutaner Injektion von 1 cm³ Kochsalz unmittelbar nach der Adrenalektomie sich die Tiere (Gruppe E) außergewöhnlich rasch erholten und schon 24 Std danach einen Leberglykogenspiegel aufwiesen, der noch höher lag als bei den vergleichbaren Tieren (Gruppe C) im 4-Tages-Versuch.

Vergleicht man die einen Tag mit Kochsalz behandelten Tiere mit denen, die einen Tag mit DOCA behandelt wurden (Gruppe F), so zeigt der erstaunlich niedrige Glykogenwert der letzteren, daß DOCA 24 Std nach Injektion noch keinen Einfluß auf die Glykogenbildung der Leber ausübt.

Die *Hungerversuche* (Gruppe G und H) zeigten schließlich, daß bei hungernden, adrenaletomierten Ratten, weder mit DOCA noch mit Kochsalz der Glykogen-Abbau aufgehalten werden kann, wie dies unter anderem auch BUELL, ANDERSON und STRAUSS feststellten.

Nach diesen Versuchsergebnissen spricht doch verschiedenes gegen eine unmittelbare Wirkung von DOCA auf die Glykogenbildung.

1. Bei den Viertages-Versuchen erreichen die DOCA-behandelten Tiere den Glykogenwert der Normaltiere. Aber auch die nur mit Koch-

salz behandelten Tiere zeigen einen deutlich höheren Glykogenspiegel als die unbehandelten Tiere. Es müssen demnach doch eine Reihe unspezifischer Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Glykogenbildung spielen. Dafür spricht auch, daß unter den mit DOCA behandelten Tieren drei auf 4tägige DOCA-Applikation überhaupt nicht reagiert haben. Ein pathologischer Befund war bei der Obduktion dieser Tiere nicht zu erheben.

2. Bei den Eintages-Versuchen war auf Kochsalz ein deutlicher Glykogenanstieg zu sehen, während die DOCA-Applikation nach 24 Std keinerlei Anstieg bewirkte. Der Glykogenwert war nach der DOCA-Verabreichung so niedrig wie bei den unbehandelten, 4 Tage lang kochsalzfrei ernährten Tieren. Demnach hat, wie schon erwähnt, DOCA 24 Std nach Injektion noch keinen Einfluß auf die Glykogenbildung der Leber ausgeübt, und so ist es verständlich, daß KENDALL u. Mitarb. 6 Std nach Adrenalektomie und DOCA-Gabe erst recht keinen Glykogenanstieg feststellten. Es ist nun sehr unwahrscheinlich, daß 24 Std nach intraperitonealer Applikation von dem in Öl gelösten DOCA noch gar nichts resorbiert worden ist. Auch VERZAR nimmt an, daß es sich wohl um einen verzögerten Wirkungseintritt, nicht aber um verzögerte Resorption handele. Wäre eine unmittelbare Wirkung von DOCA auf die Glykogenbildung der Leber vorhanden, so müßten schon kleine Mengen von resorbiertem Hormon, das ja in unseren Versuchen in Überdosierung verabreicht wurde, zu einem sofortigen Glykogenaufbau führen; ist es doch eine wesentliche Eigenschaft der Hormone, schon in geringsten Mengen zu wirken. Dieser verzögerte Wirkungseintritt kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß wichtige Voraussetzungen für eine Glykogenspeicherung fehlen, die sich der Körper erst schaffen muß. Erst danach kommt es zu einem meßbaren Glykogenanstieg, der aber nicht nur durch DOCA, sondern auch durch Kochsalzzufuhr, wenn auch in geringerem Maße, zu erzielen ist. Daß aber Kochsalz allein schon einen eindeutigen Effekt aufweist, läßt vermuten, daß es sich in beiden Fällen um die gleichen, allgemeinen Regulationsvorgänge handeln muß, wie Normalisierung des Kreislaufs, des Wasserhaushalts, der Enzymaktivität usw.

3. In den Hungerversuchen mußte sich schließlich am eindeutigsten zeigen, ob der rasch einsetzende Glykogenschwund sich durch eine spezifische DOCA-Wirkung aufheben oder wenigstens verzögern ließ. Um der Tatsache gerecht zu werden, daß DOCA zu seiner Wirkung erst einer gewissen Anlaufzeit bedarf, behandelten wir die adrenalektomierten Tiere zunächst 3 Tage mit DOCA unter Normalkost und ließen erst am 4. Tage hungern, unter Fortsetzung der DOCA- bzw. Kochsalzmedikation. Trotz dieser Maßnahmen ließ sich weder durch Kochsalz noch durch DOCA der Glykogenabfall aufhalten. Auch nach der mehrtägigen DOCA-Zufuhr verschlechterte sich schon während eines einzigen Hungertages das Be-

finden der Tiere rasch ganz erheblich und das Leberglykogen sank fast auf Null ab. Dies müßte sich aber zumindest verzögern lassen, wenn DOCA spezifische Wirkungen auf den Glykogenhaushalt besäße.

Auf Grund dieser Beobachtungen möchten wir annehmen, daß DOCA auf die Glykogenbildung der Leber nur unmittelbar einwirkt, indem es eine Reihe von Stoffwechselvorgängen normalisiert, die sich im einzelnen heute noch nicht völlig übersehen lassen.

Zusammenfassung.

Der Glykogengehalt der Leber adrenaletomierter Ratten wurde bei unbehandelten, mit DOCA und mit Kochsalz behandelten Tieren sowie am Hungertier untersucht, unter besonderer Berücksichtigung des Zeitfaktors. Er stieg bei adrenaletomierten Ratten sowohl auf DOCA- als auch auf Kochsalzbehandlung nach 4tägiger Verabreichung an. Hierbei war die DOCA-Behandlung in der Wirkung stärker und führte zu einer annähernden Normalisierung des Leberglykogens.

Das in Öl gelöste DOCA bewirkt 24 Std nach Injektion am kochsalzfrei ernährten adrenaletomierten Tier noch keine Zunahme des Leberglykogens, während die Infusion von 1 ml einer 1% igen Kochsalzlösung nach 24 Std schon einen deutlichen Glykogenanstieg zur Folge hat.

Beim Hungertier vermag trotz mehrtägiger Vorbehandlung weder Kochsalz noch DOCA den Glykogenabbau aufzuhalten.

Auf Grund der Beobachtungen wird angenommen, daß kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen DOCA-Medikation und Glykogenbildung in der Leber besteht.

Literatur.

- ARTUNDO, A.: C. r. Soc. Biol. **97**, 411 (1927). — BUELL, M. V., J. A. ANDERSON and M. B. STRAUSS.: Amer. J. Physiol. **113**, 274 (1936). — DEUEL, H.: J. Biol. Chem. **119**, 607 (1937). — EGER, W., und H. OTTENSMEIER: Z. exper. Med. **119**, 338 (1952). — FISHER, R. A.: Statistical Methodes for Research Workers, Edinburgh 1950, p. 114—174. — FISHER, R. A., und F. YATES: Agricultural a. Med. Research London, Edinburgh 1949, p. 44. — HAAS, H.: Arch. exper. Path. und Pharmakol. **204**, 110 (1947). — HALLMANN, L.: Klin. Chem. u. Mikroskopie. G. Thieme 1952. — HARTMANN, F. A., and K. A. BROWNELL: The Adrenal Gland. Philadelphia 1949. — HAUSERGER, F. X.: Klin. Wschr. **1949**, 100. — KENDALL, E. C.: (1) J. Amer. Med. Assoc. **116**, 2394 (1941). — (2) Endocrinology **30**, 853 (1942). — (3) Conf. on Metab. asp. of convalescence transact. 10th meet (1945). — OBERDISSE, K., u. H. W. HERING: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 46 (1948). — RONA, P.: Prakt. d. physiol. Chem. Bd. II. Berlin: Springer 1929. — SWINGLE, W. W., u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **78**, 865 (1951). — VERZAR, F.: (1) Schweiz. med. Wschr. **1941**, 101; **1942**, 661. — (2) Schweiz. med. Wschr. **1950**, 468. — VERZAR, F., u. E. SAILER: Helvet. physiol. Acta **10**, 247 (1952). — VERZAR, F., u. V. WENNER: Biochem. J. **42**, 42 (1948). — WIDSTRÖM, G.: Acta med. scand. **90**, 397 (1936).

Dr. Dr. NORWIN KELLER, Medizinische Klinik der Justus-Liebig-Hochschule Gießen.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg (Direktor: Prof. Dr. H. E. Bock).

Vergleichende Untersuchungen des Na-, K- und Ca-Gehaltes und der Eiweißfraktionen in Serum, Ascites und Pleuraergüssen.

Von

OSKAR KARGES und WOLFGANG MOND.

(Eingegangen am 24. August 1953.)

Die Verteilung der Ionen zwischen Blut und Gewebsflüssigkeit einerseits und zwischen Gewebsflüssigkeit und Zellen andererseits gehorcht bestimmten Gesetzmäßigkeiten. Es interessierte uns zu erfahren, ob zwischen Ionen und Eiweißgehalt irgendein Zusammenhang besteht bei den pathologisch auftretenden Flüssigkeitsansammlungen in den Körperhöhlen.

Wir haben bei 18 Exsudaten und 13 Transsudaten als wichtigste Kationen Na, K und Ca untersucht und gleichzeitig das Gesamteiweiß und die einzelnen Eiweißfraktionen bestimmt. Na, K und Ca wurden mit dem von DUNKER konstruierten Flammenphotometer untersucht. Das Gesamteiweiß bestimmten wir mit der BIURET-methode, die Eiweißfraktionen mittels der Papierelektrophorese nach GRASSMANN. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 1 und 2 aufgeführt.

Wir fanden bei den Lebercirrhosekranken übereinstimmend mit der Literatur eine Erniedrigung der Kationenkonzentration und eine geringe

Tabelle 1.

	Diagnose	Serum			Ascites		
		Na mg%	K mg%	Ca mg%	Na mg%	K mg%	Ca mg%
1.	Lebercirrhose	290	19,1	8,5	292	19,7	5,5
2.	„	318	—	7,4	318	—	5,6
3.	„	285	19,8	—	288	18,2	5,7
4.	„	294	19,3	7,2	305	16,5	5,5
5.	„	273	—	8,0	315	14,4	4,3
6.	„	330	—	9,0	330	17,9	5,4
7.	„	315	17,5	7,5	313	15,1	5,5
8.	„	—	16,4	8,7	—	16,8	6,2
9.	„	334	13,0	8,1	292	10,9	4,1
10.	„	283	14,3	9,0	317	12,5	3,7
11.	„	284	15,0	7,9	289	13,8	4,2
	Mittelwerte	301	16,8	8,1	306	15,6	5,1
	Signifikanz	±22	±2,5	±0,7	±15	±2,7	±0,8
					0,6	1	10

Erniedrigung des Gesamteiweißgehaltes im Serum gegenüber der Norm, außerdem, da es sich um reine Transsudate handelte, einen sehr geringen Gesamteiweißgehalt im Ascites. Um zu sehen, ob diesem Serumbefund die Werte im Ascites entsprechen und ob eine Abhängigkeit des Kationen- gehaltes von der Höhe des Eiweißgehaltes besteht, haben wir die Befunde, die wir an Lebercirrhosekranken erhoben haben, gesondert in Tab. 1 zusammengestellt.

Die Diagnose wurde bei den 6 Patienten durch Leberbiopsie histologisch gesichert. Bei Fall Nr. 3 und 4, 5 und 6, 7 und 8, 9, 10 und 11 handelt es sich jeweils um die gleichen Patienten. Der Abstand zwischen den Punktionen betrug jedesmal etwa 6 Wochen. Zwischen Na-Gehalt im Ascites und im Serum besteht kein Unterschied. Die Konzentration des K im Ascites ist etwas niedriger als im Serum. Beim Ca ist die Differenz der Konzentration zwischen Serum und Ascites am deutlichsten ausgeprägt; der mittlere Ca-Gehalt des Serums beträgt 8,1 mg%, der des Ascites 5,1 mg%. Das Gesamteiweiß beträgt im Serum im Mittel 6,24 g%, im Ascites 1,03 g%. Die Albuminfraktion liegt im Ascites relativ höher als im Serum, das gleiche gilt fast ausnahmslos für die α_1 -Globulinfraktion. α_2 , β -, γ -Globulin sind im Ascites meist niedriger als im Serum.

Da uns bei den übrigen Erkrankungen im Gegensatz zur Lebercirrhose keine spezifischen Veränderungen des Kationen- oder Eiweißgehaltes auffielen und solche auch in der Literatur nicht beschrieben sind, haben wir sie gemeinsam in einer Tabelle aufgeführt.

Bei diesen Ergüssen besteht im Vergleich zum Serum kein Unterschied im Na-Gehalt, der K-Gehalt liegt etwas niedriger als der des

Tabelle 1.

Ges. Eiw. g%	Serum					Ges. Eiw. g%	Ascites				
	Alb.	Glob. α_1	α_2	β	γ		Alb.	Glob. α_1	α_2	β	γ
6,4	26,8	4,6	6,2	18,6	43,8	0,7	34,6	4,7	4,3	15,2	41,2
5,3	23,1	8,0	12,8	19,4	36,7	0,7	26,2	17,8	7,1	19,1	29,8
7,8	19,5	2,8	3,3	5,1	69,3	1,4	25,8	3,4	3,9	5,9	61,0
7,2	23,8	2,3	3,0	14,1	56,8	0,6	30,7	3,3	2,6	11,1	52,3
6,7	22,6	3,9	5,2	11,7	56,6	2,5	28,1	3,9	1,1	8,4	58,4
5,9	42,2	4,2	5,3	10,9	37,4	1,0	49,6	4,3	4,1	11,8	30,2
5,7	40,5	5,2	6,9	9,8	37,6	0,9	46,6	5,0	5,6	10,4	32,4
6,0	29,8	6,0	8,5	13,6	42,1	1,7	42,9	5,7	3,7	7,8	39,9
5,3	24,2	6,5	9,7	13,8	45,8	0,5	34,5	8,3	7,2	14,8	35,2
5,3	27,9	7,3	9,0	19,6	36,2	0,8	42,0	8,9	5,4	13,1	30,6
—	30,9	5,1	6,5	12,0	45,5	0,5	30,1	4,9	2,8	8,8	53,4
6,2	28,3	5,1	6,9	13,5	46,2	1,0	35,6	6,2	4,3	11,5	42,2

Tabelle 2.

	Diagnose	Serum			Pleura		
		Na mg%	K mg%	Ca mg%	Na mg%	K mg%	Ca mg%
1.	Lungeninfarkt	320	19,3	8,9	283	14,2	4,3
2.	Pleurit. exsudat.	313	—	8,0	338	17,5	9,2
3.	" "	—	15,7	8,7	—	—	7,0
4.	" "	328	17,2	9,5	323	17,1	7,1
5.	" "	319	—	8,7	343	15,9	7,8
6.	" "	—	—	—	—	—	5,6
7.	" "	326	19,8	9,0	324	16,0	7,5
8.	" "	—	—	—	309	17,3	7,2
9.	" "	309	19,3	10,0	308	16,3	7,0
10.	" "	308	18,5	9,9	319	18,0	7,7
11.	" "	309	—	9,6	296	—	7,6
12.	" "	316	—	11,2	320	—	9,5
13.	Melanosarkom	311	18,4	8,0	309	17,5	7,5
14.	Retothelsarkom	—	—	9,8	—	15,2	6,6
15.	Ca-Metastasen	320	—	9,8	314	16,4	6,7
16.	Herzinsuffizienz	352	21,0	9,8	328	17,9	7,2
17.	" "	316	—	9,2	295	17,9	6,7
18.	Panzerherz	—	—	—	—	16,1	—
19.	Pleurit. exsudat.	—	—	—	328	—	—
20.	" "	312	15,2	—	—	—	—
21.	" "	—	—	—	—	—	—
22.	" "	—	—	—	—	—	—
23.	" "	—	—	—	—	—	—
Mittelwerte		319	18,3	9,3	316	16,7	7,2
Signifikanz		±13	±1,9	±0,9	±27	±1,1	±1,2
					0,6	2,3	5

Serums, der Unterschied ist aber nicht eindeutig. Der Ca-Gehalt der Pleuraergüsse ist deutlich niedriger als der des Serums, er beträgt im Serum 9,3 mg% und in den Ergüssen 7,2 mg%. Bei allen Patienten, gleich ob sie an entzündlichen Erkrankungen, Herzinsuffizienz oder malignen Tumoren litten, wurde im Serum das Albumin, bei normalem Gesamteiweiß von 7,4 g%, erniedrigt gefunden. Das α -Globulin war bei allen Patienten — mit Ausnahme der beiden an Herzinsuffizienz Erkrankten — erhöht als Zeichen des bestehenden entzündlichen Prozesses. β -Globulin war in allen Fällen normal, γ -Globulin je nach Art der Entzündung normal oder vermehrt. In den Pleuraergüssen beträgt der Gesamteiweißgehalt 4,4 g%, das Albumin und das α_1 Globulin ist relativ höher als im Serum, während die α_2 -, β -, γ -Globuline relativ vermindert sind.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ist zu entnehmen, daß in den Ergüssen Na und K in der Größenordnung mit den Werten im Serum übereinstimmen. Zwar ist die K-Konzentration in den Ergüssen etwas niedriger als im Serum, doch kann man aus diesen geringen Unterschieden keine Schlußfolgerungen auf einen aktiven

Tabelle 2.

Ges. Eiw. g %	Serum					Ges. Eiw. g %	Pleura				
	Alb.	Glob. a ₁	a ₂	β	γ		Alb.	Glob. a ₁	a ₂	β	γ
6,9	43,5	6,7	18,4	12,7	18,7	4,3	58,0	6,7	10,9	8,4	16,0
7,4	56,2	5,2	14,1	6,7	17,8	4,8	61,0	4,8	10,2	7,1	16,9
6,8	49,9	6,4	11,5	13,3	18,9	5,7	56,5	7,3	9,7	9,7	16,8
9,7	44,6	6,5	11,5	10,0	27,4	4,5	40,8	10,5	14,5	12,1	22,1
8,0	34,6	8,2	18,2	11,8	27,2	4,9	45,4	5,9	8,7	11,3	28,7
—	38,8	6,9	14,2	12,5	27,6	—	38,2	9,9	11,0	14,5	26,4
7,9	41,0	11,9	16,1	12,6	18,4	5,7	44,8	9,3	17,4	12,4	16,1
—	—	—	—	—	—	5,5	35,2	5,7	10,3	10,1	35,7
7,1	43,6	5,4	8,4	15,6	27,0	1,7	58,0	6,7	5,8	10,3	19,2
7,4	38,1	7,7	12,7	13,0	28,5	5,4	39,6	8,2	11,7	16,3	24,2
8,6	37,7	10,5	14,9	10,5	26,4	3,4	45,4	8,4	7,7	9,2	29,3
6,6	51,8	6,0	11,9	11,9	18,4	5,4	53,6	7,4	11,9	10,9	16,2
6,5	45,1	8,0	14,3	14,7	17,9	4,8	54,3	9,3	10,2	12,4	13,8
5,5	45,3	7,7	11,5	13,1	22,4	5,4	45,5	8,1	6,1	9,9	30,4
8,1	29,9	7,9	11,5	16,5	34,2	1,2	38,7	8,1	7,0	13,8	32,4
7,3	43,3	5,8	5,1	9,8	36,0	2,6	48,8	6,0	4,4	8,6	32,2
6,8	47,0	9,5	6,9	12,8	22,9	—	54,0	8,6	6,0	11,5	19,9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	5,3	55,5	5,7	5,0	9,0	24,8
6,8	30,2	8,6	15,1	11,6	34,5	3,9	38,9	7,8	15,0	12,0	26,3
—	35,0	4,4	13,8	15,8	31,0	—	52,1	6,1	6,5	12,3	23,0
7,5	33,5	6,5	12,2	12,4	35,4	—	41,8	7,1	8,4	11,1	31,6
—	45,7	5,0	13,2	13,2	22,9	—	51,7	5,8	8,1	13,4	21,0
7,4	41,7	7,2	12,8	12,5	25,7	4,4	48,3	7,4	9,7	11,2	23,7

K-Transport ziehen. Für die gefundenen Werte kann nicht genau ausgesagt werden, ob ein Gleichgewicht in der Verteilung vorliegt. Die Diffusion der Ionen aus dem Blut in die Ergüsse spielt sich zwischen zwei Räumen ab, bei denen der eine, nämlich der Erguß, ein großes Volumen bei relativ kleiner diffundierender Oberfläche hat. Es wird daher die Zeit, die benötigt wird, um ein Diffusionsgleichgewicht zu erreichen, umso größer sein, je ungünstiger das Verhältnis zwischen Volumen und diffundierender Oberfläche ist. Es können daher sowohl im Verlauf der Entstehung wie auch der Resorption Störungen des Gleichgewichtszustandes auftreten und es ist möglich, daß die in den einzelnen Fällen gefundenen verschiedenen Abweichungen hierdurch bedingt sind. Es ist wahrscheinlich anzunehmen, daß für die Ionenverteilung zwischen Blut und Ergüssen die gleichen Gesetze maßgeblich sind, wie sie zwischen Blut und normaler Gewebsflüssigkeit gelten, d. h. daß die Ionenverteilung dem DONNAN-Gleichgewicht folgt. Deutlichere Konzentrationsunterschiede sind beim Ca festzustellen.

Hier ist darauf hinzuweisen, daß die flammenphotometrische Bestimmung des Ca eine erhebliche Fehlerbreite besitzt. RIETHMÜLLER z. B. findet Abweichungen von $\pm 5,5\%$ bei normalcalcämischen und $\pm 8,9\%$ bei hypocalcämischen Werten gegenüber der direkten acidimetrischen Titrationsmethode nach SOBEL-SLETSKY. Aus unseren Werten soll deshalb lediglich ein Vergleichsschluß gezogen werden

zwischen Serum und Exsudaten bzw. Transsudaten. In der eiweißarmen Ascitesflüssigkeit der Lebercirrhosekranken liegt der Ca-Gehalt am niedrigsten, in den eiweißreicheren Pleuraergüssen ist der Ca-Gehalt höher, aber immer noch deutlich niedriger als in den entsprechenden Seren. Diese Unterschiede im Ca-Gehalt hängen zweifellos mit dem Eiweiß zusammen. Die Tatsache, daß die Löslichkeit des Ca durch Eiweiß erhöht wird, ist bekannt. Ob es sich um eine Bindung von Ca an Eiweiß oder um eine Löslichkeitserhöhung durch Komplexbildung handelt, kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden. Die in den Tab. 1 und 2 aufgegliederten Eiweißfraktionen liefern keine sicheren Anhaltspunkte dafür, daß die Größe der Ca-Konzentration mit einer der analysierten Eiweißfraktionen in Verbindung gesetzt werden kann. Im übrigen gelten für das Ca die gleichen Erwägungen, die für die Einstellung des Gleichgewichtes oben in Betracht gezogen wurden. Jedenfalls kann ein aktiver Transport des Ca ebenfalls als unwahrscheinlich bezeichnet werden.

Bei vergleichenden Untersuchungen in Serum und Ergüssen fand LUETSCHER eine Übereinstimmung der Eiweißfraktionen zwischen denselben. Das Albumin fand er in den Ergüssen, besonders bei Herzinsuffizienzen höher als im Serum. Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen überein, nur daß wir die von ihm beschriebene Erniedrigung des β -Globulins nicht gefunden haben. Die relative Vermehrung des Albumins im Erguß wird im allgemeinen in Zusammenhang gebracht mit dem kleineren Albuminmolekül, welches die Membran leichter passieren kann. DONALD u. a. haben festgestellt, daß bei Lebercirrhosen die Konzentration der Kationen deutlich niedriger ist als in der Norm. Diese Untersuchungen können wir bestätigen, wenn auch unsere Werte nicht ganz so niedrig liegen, was wohl darauf zurückgeführt werden kann, daß in dem Material der amerikanischen Untersuchungen nur Endzustände der Krankheit analysiert wurden, während es sich bei unseren Fällen um verschieden schwere Verlaufsformen der Lebercirrhose handelt.

Zusammenfassung.

Bei 18 Exsudaten und 13 Transsudaten wurde Na, K und Ca sowie der Gesamteiweißgehalt und die prozentuale Verteilung der einzelnen Eiweißfraktionen untersucht. Bei den Lebercirrhosekranken war Na, K und Ca sowie das Gesamteiweiß in Serum und Ascites vermindert. Bei allen untersuchten Fällen war das Ca in den Ergüssen deutlich niedriger als im Serum, während die Konzentration des Na und K in beiden etwa gleich war. Da der geringere Ca-Gehalt der Ergüsse durch den niedrigen Gesamteiweißgehalt erklärt ist, haben wir aus den Ergebnissen geschlossen, daß die Verteilung der Ionen in den Ergüssen den gleichen Gesetzmäßigkeiten folgt wie die Verteilung der Ionen zwischen Serum und normaler Gewebsflüssigkeit. Die Ionenverteilung zwischen Serum und pathologischen Flüssigkeitsansammlungen gehorcht also dem DONNAN-Gleichgewicht.

Literatur.

BALINT, B., u. G. BEUKÖ: *Experientia* (Basel) **3**, 458 (1947). — LINNEWEEH, F.: *Klin. Wschr.* **1939**, 350. — *M Schr. Kinderheilk.* **1944**, 329. — LUETSCHER, H.: *J. Clin. Invest.* **19**, 313 (1941). — PEREZ-SANDOVAL, D., y E. ROTTELER: *Rev. clin. españ.* **36**, 41 (1950). — RIETHMÜLLER, H. U.: *Klin. Wschr.* **1953**, 527. — SEEKLER, L.: *Nederl. Arch. Physiol.* **22** (1937). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: *Bluteiweißkörper des Menschen* (1951).

Dr. OSKAR KARGES, Physiol. Chem. Institut Mainz.

Aus dem Max-Planck-Institut für physikalische Chemie Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. K. F. BONHOEFFER).

Über die Zunahme der Akkommodationskonstanten λ des isolierten N. ischiadicus nach Zusatz von Hyaluronidase.

Von

HANS-CHRISTOPH LÜTTGAU.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Oktober 1953.)

Einleitung.

Die Akkommodationskonstante λ (HILL) einzelner Nervenfasern nimmt zu, wenn man die umhüllende Schicht des Bindegewebes (Epi- und Perineurium¹) entfernt (SATO). SATO führt diesen Effekt auf die Polarisierbarkeit des Epineuriums zurück, wodurch der Anstiegswinkel der Reizspannung abgeflacht und somit am Nervenstamm mit Bindegewebe eine höhere Akkommodation vorgetäuscht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche von SATO in der Weise abgewandelt, daß das Epineurium nicht mechanisch entfernt wurde, wobei die Einzelfaser gezerzt und in ihren physiologischen Eigenschaften verändert werden könnte, sondern indem es auf fermentativem Wege durch Hyaluronidase teilweise abgebaut und aufgelockert wurde.

Hyaluronidase ist bekanntlich ein Fermentkomplex, durch den ein depolymerisierender Abbau der Hyaluronsäure erfolgt, die ein wesentlicher Bestandteil der Zwischenzellsubstanz mesodermaler Gewebe ist (GIBIAN).

Methodik.

Es wurden Nerv-Muskel-Präparate des Grasfrosches (*Rana temporaria*) untersucht, die vor Beginn des Versuches bereits 1—2 Std in gepufferter RINGER-Lösung gelegen hatten. Reizschwelle und Akkommodation wurden mit einem Rechteckimpulsgenerator und einer Reizgerätanordnung nach SATO vor und nach Zusatz von Hyaluronidase gemessen, Abb. 1, I und II. Und zwar a) an isolierten motorischen Nerveneinzelfasern (nur Reizschwelle), b) am von Bindegewebe befreiten Ramus muscularis des Nervus tibialis und c) am Nervenstamm mit umgebendem Epineurium. Als Indicator diente die Muskelzuckung.

Berechnung der Akkommodationskonstanten λ : Es wurde der „Minimale Gradient μ “ mit der Reizanordnung nach SATO gemessen (Abb. 1). Variation der Reizspannung durch den Schiebewiderstand R . Variation des Anstiegswinkels der Reizspannung durch den Kondensator C . Nach TASAKI ergibt sich der „Minimale

¹ Literatur über die anatomischen und physiologischen Eigenschaften des Epineuriums bei STÄMPFLI.

Gradient μ “ bei dieser Versuchsanordnung aus der Formel: $\mu = \frac{v-\beta}{r \cdot c}$, $r \cdot c =$ Zeitkonstante des Spannungsanstieges; $\beta =$ Rheobase; $v =$ Schwellenspannung für die jeweilige Zeitkonstante $r \cdot c$. Mit Hilfe des „Minimalen Gradienten“ und der Rheobase läßt sich dann die Akkommodationskonstante λ nach der Gleichung $\lambda = \frac{\beta}{\mu}$ berechnen.

Die Testlösung wurde mit Mikropipetten zwischen den in der Abb. 1 gezeigten Kunststoffstreifen zugesetzt. pH 5,6.

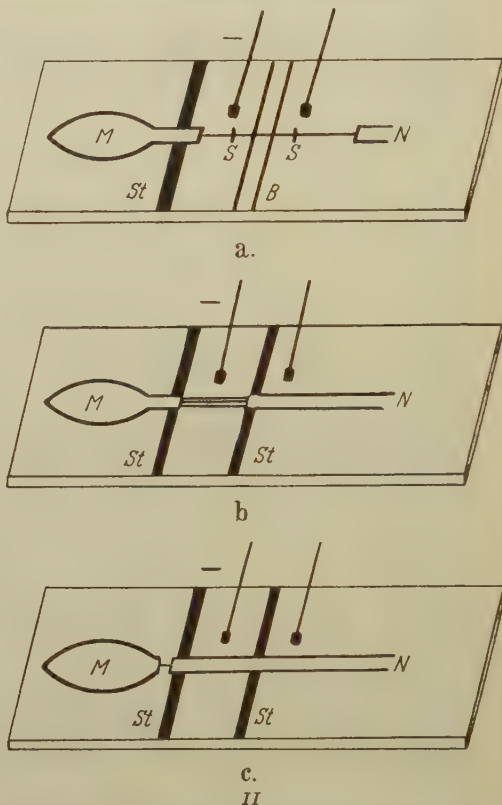
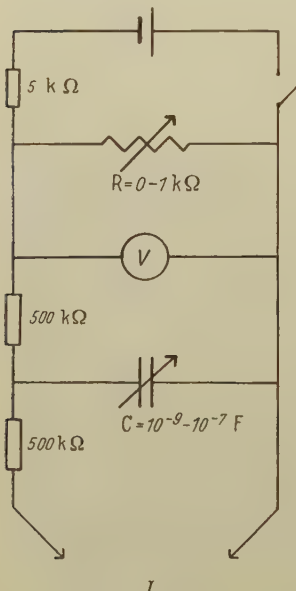


Abb. 1. I Reizapparat nach SATO. II Anordnung der Nerv-Muskel-Präparate auf dem Objektträger. Einzelheiten im Text. B Brückenisolator, M Muskel, N Nervus ischiadicus, S Schnürring einer Einzelfaser, St Streifen aus dem Kunststoff Teroson, 3 mm hoch und breit, festklebend auf dem Objektträger. Die Testlösung wurde zwischen den Kunststoffstreifen zugesetzt. Elektroden aus Silber-Silberchlorid.

Ergebnisse.

a) An der isolierten *Einzelfaser* wurde nur die Schwelle gemessen. Bis zu 5 Einheiten¹ Hyaluronidase/0,1 ml RINGER-Lösung, an den aus der Abb. 1 zu ersiehenden Stellen zugesetzt, veränderten die Schwelle während einer Einwirkungszeit von 15–20 min nicht. Wurde jedoch die Konzentration von Hyaluronidase verdoppelt, so stieg die Schwelle

¹ Schering-Einheiten. Hyaluronidase-Präparat „Kinetin“ der Fa. Schering A.G. Berlin-West.

innerhalb von 5—10 min bis zur Unerregbarkeit. Ersetzte man die Testlösung jedoch durch einfache RINGER-Lösung, bevor die Schwelle den doppelten Ausgangswert überschritten hatte, so sank diese innerhalb von 1—2 min bis auf einen Wert, der einige Prozent über dem Ausgangswert lag, ab (Abb. 2).

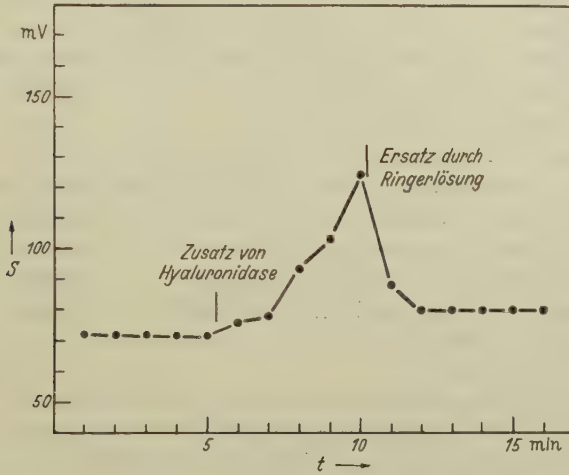


Abb. 2. Schwellenänderung eines isolierten Schnürringes einer Nervenfasernach Zusatz von 10 Einheiten Hyaluronidase pro 0,1 ml RINGER-Lösung. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Reizschwelle in mV.

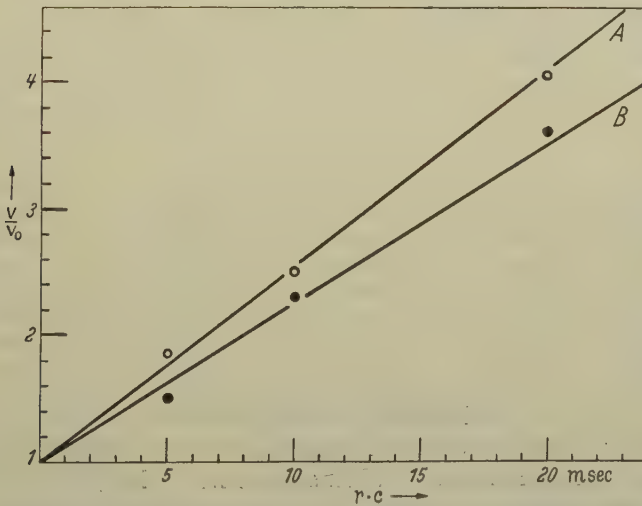


Abb. 3. Verhältnis von Schwellenspannung zur Anstiegszeit der Reizspannung. A vor und B nach Zusatz vom Hyaluronidase. Abszisse: $r \cdot c$ = Zeitkonstante der Reizspannung (msec). Ordinate:

$\frac{v}{v_0}$; v_0 = Rheobase (mV), v = Reizschwelle für die jeweilige Zeitkonstante (mV).

b) Die Versuche an *von Bindegewebe befreiten Nervenstämmen* lassen sich mit denen an der Einzelfaser vergleichen. Bei Zusatz geringer Mengen „Kinetin“ änderten sich Schwelle und Akkommodation nicht. Höhere Konzentrationen bewirkten ein Schwellenansteigen, manchmal verbunden mit einer geringen Abnahme der Akkommodation. (Die Empfindlichkeit der einzelnen Nervenstämmen gegenüber dem Präparat war sehr verschieden; ein geringes Schwellenansteigen konnte in einigen Fällen schon ab einer Einheit Hyaluronidase/0,1 ml RINGER beobachtet werden. Einwirkungszeit 20 min.) Der Effekt der Hyaluronidase war wie an der Einzelfaser reversibel.

c) Am *gesamten Nervenstamm* wurde bei Zusatz von einer Einheit Hyaluronidase/0,1 ml RINGER während der bis zu 30 min dauernden Einwirkungszeit keine Schwellen- oder Akkommodationsänderungen beobachtet. Höhere Konzentrationen bewirkten ein irreversibles Absinken des minimalen Gradienten (und damit eine Abnahme der Akkommodation) nach 10—20 min um durchschnittlich 10%, wobei die Schwelle konstant blieb oder gering absank. Dazu Tab. 1 und Abb. 3.

Tabelle 1. *Abnahme des „Minimalen Gradienten“ nach Zusatz von 5 Einheiten Hyaluronidase pro 0,1 cm³ am gesamten Nervenstamm mit Epineurium. Abb. 1 IIc.*

Spalte I: „Minimaler Gradient“ μ vor Zusatz der Hyaluronidase.

II: „Minimaler Gradient“ μ 15 min nach Zusatz der Hyaluronidase.
(Mittelwert aus $r \cdot c = 10$ u. 20 msec).

III: Abnahme des „Minimalen Gradienten“ in Prozent.

IV: Schwellenänderung nach Zusatz von Hyaluronidase in Prozent.

Temperatur 20—25° C. pH 5,6. μ in mV pro msec.

Versuch Nr.	I	II	III %	IV %
A 1	61	55	— 9,8	0
A 2	45	40	—11,0	—1,5
A 3	54	54	0	0
A 4	84	71	—15,5	—2,1
A 5	74	68	— 8,1	—2,3
A 6	51	44	—13,7	—2,4
A 7	31	28	— 9,6	0
A 8	49	44	—10,0	0
A 9	56	52	— 7,2	+4,0
A 10	30	27	—10,0	0

Besprechung der Ergebnisse.

Die Untersuchungen an der Einzelfaser und an von Bindegewebe befreiten Nervenstämmen zeigen, daß spezifische Wirkungen der Hyaluronidase an der Nervenfaser selbst nicht nachzuweisen sind. Das bei überhohen Kinetin-Konzentrationen auftretende Schwellenansteigen ist wegen der Reversibilität auf unspezifische Wirkungen des Präparates

zurückzuführen. Am gesamten Nervenstamm sind demgegenüber die Wirkungen des Präparates irreversibel, und es kommt während der Einwirkungszeit von 30 min niemals zu einem Schwellenansteigen. Die Schwelle sinkt vielmehr oft um ein bis zwei Prozent. Man kann damit sagen, daß es sich hierbei nicht um unmittelbare Wirkungen auf die einzelnen Nervenfasern handelt, sondern daß das Bindegewebe als der alleinige Wirkungsort der Hyaluronidase zu betrachten ist. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von NORDQUIST (1952) gestützt, der ebenfalls zeigte, daß die physiologischen Eigenschaften der Nervenfasern bei Zusatz von Hyaluronidase (in physiologischen Dosen) nicht verändert werden, daß aber die Diffusionsgeschwindigkeit von Procain durch das Epineurium erhöht wird. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man sagen, daß durch die vorliegenden Akkommodationsmessungen die in der Einleitung mitgeteilten Überlegungen von SATO bestätigt werden. D. h. das Epineurium wird durch die Hyaluronidase aufgelockert, seine Polarisierbarkeit verringert sich und die durch diese Polarisierbarkeit vorgetäuschte Akkommodation des Nerven nimmt ab. Nach Untersuchungen von G. MANECKE und E. OTTO-LAUPENMÜHLEN (1953) an Bindegewebsmembranen kann man die Abnahme der Polarisierbarkeit und die Zunahme der Permeabilität mit der Abnahme der Festionkonzentration und Vergrößerung der Porenweite erklären.

Ich danke der Fa. Schering A.G. Berlin für die Überlassung des Hyaluronidase-Präparates „Kinetin“.

Zusammenfassung.

Zusatz von Hyaluronidase verringert die Akkommodation des isolierten N. ischiadicus von *Rana temporaria*. Dieser Effekt wird mit der Abnahme der Polarisierbarkeit des Epineuriums bei Zusatz des Fermentkomplexes erklärt.

Literatur.

GIBIAN, H.: Chemie, biologische Bedeutung und klinische Anwendung der Hyaluronidase. *Angew. Chem.* **63**, 105 (1951). — HILL, A. V.: Excitation and accommodation in nerve. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **119**, 305 (1936). — MANECKE, G., u. E. OTTO-LAUPENMÜHLEN: Der Einfluß von Hyaluronidase auf das Membranpotential von Bindegewebsmembranen. *Z. Naturforsch.* **8b**, 285 (1953). — NORDQUIST, P.: The action of hyaluronidase on Frog Sciatic nerve, with special reference to penetration of procaine. *Acta pharmacol. (Køpenh.)* **8**, 195 (1952). — SATO, M.: Effect of the connective tissue sheath on the value of the accommodation constant λ of a nerve fiber. *Jap. J. Physiol.* **2**, 270 (1952). — STÄMPFLI, R.: Bau und Funktion isolierter markhaltiger Nervenfasern. *Ergebn. Physiol.* **47**, 70 (1952). — TASAKI, I.: The threshold conditions in electrical excitation of the nerve fiber. Part. II. *Cytologia* **15**, 219 (1950).

Dr. HANS-CHRISTOPH LÜTTGAU, Max-Planck-Institut f. Physikalische Chemie, Göttingen, Bunsenstraße 10.

Aus der I. Med. Univ.-Klinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. LAUDA)
und der Internen Abteilung des Paracelsus-Institutes, Bad Hall O.-Ö.
(Leiter: Prof. Dr. E. LAUDA).

Die Verwertung von Jodid und elementarem Jod durch die Schilddrüse des Hundes bei direktem Angebot.

Von

D. HOFMANN-CREDNER.

(Eingegangen am 1. September 1953.)

Die unterschiedliche Wirkung von elementarem Jod und dem Jodion (Jodid) bei klinischer Applikation (HÄUSLER u. Mitarbeiter) veranlaßte uns zu untersuchen, ob hinsichtlich der Aufnahmefähigkeit und Verwertung durch die Schilddrüse erfaßbare Unterschiede zwischen intravasal angebotenem ionisierten und freien Jod bestehen. Im folgenden sollen die tierexperimentellen Ergebnisse unter dem genannten Gesichtspunkt dargestellt werden.

A. Vorversuche. Wäßrige Testlösungen von ^{131}J (in Form der von HARWELL versandten Originallösung von trägerfreiem NaJ^{131}) mit und ohne Trägerzusatz von Natriumjodid bzw. elementarem Jod wurden der Papierelektrophorese unterworfen (Natrium-Veronalpuffer pH 8,6). Dauer des Stromdurchgangs: 10, 15, 20, 30 und 60 min. Die Ausmessung der Aktivitätsmaxima auf dem Elektrophorese-Filterpapierstreifen erfolgte bei diesen und allen folgenden Versuchen mit dem von uns entwickelten einfachen Zusatzgerät (HOFMANN-CREDNER) zur Auswertapparatur der Firma Bender & Hobein, München, Type Elphor H.

B. Tierversuche. Verwendet wurden Hunde (Mischrassen), die bei normaler Kost außerhalb des Jodmilieus von Bad Hall aufgezogen wurden. In Vollnarkose wurde nach medianem Halsschnitt die Schilddrüse freipräpariert und alle zu- und abführenden Gefäße bis auf eine Arterie (A. thyreoid. inf.) und eine contralaterale Vene unterbunden. Die nichtligierten Gefäße wurden durch zwei laterale Hautschnitte vorgeklappt, der Medianschnitt provisorisch verschlossen. In die vorgelagerte Arterie wurde unter weitgehender Vermeidung eines Überdruckes die Testlösung eingespritzt und aus der contralateralen Vene in kurzen Abständen bis zur Dauer von 6 Std mittels einer heparinisierten Injektions-Spritze Blut abgenommen. Sofort nach der Entnahme wurde die Aktivität des heparinisierten Vollblutes und das Gewicht der Probe bestimmt. Nach anschließendem kurzen scharfen Zentrifugieren wurde die elektro-

phoretische Trennung des gewonnenen Plasmas angesetzt. Die elektrische Auftrennung wurde nach 15, 30, 60 min und nach 12 Std unterbrochen und die Filterstreifen in einem eigenen, besonders langen Transportrahmen des Auswertgerätes auf vorhandene Aktivitätsmaxima mit dem Geiger-Müller-Zählrohr abgetastet. Nach 15stündiger Auftrennungsdauer wurden die Streifen in üblicher Weise ausgewertet und eine nochmalige Aktivitätskontrolle durchgeführt.

Als Testlösungen wurden injiziert:

Hund I : Trägerfreies ^{131}J (in Form der von HARWELL versandten Originallösung von NaJ^{131}) 0,3 ml; 250 μC ,

Hund II : Radioaktiv markiertes Natriumjodid 0,3 ml; 250 μC , mit Trägerzusatz von 13 γ NaJ.

Hund III: Wäßrige Lösung von NaJ^{131} 0,3 ml; 250 μC mit Trägerzusatz von 10 γ J_2 .

Ergebnisse.

A. Vorversuche.

Bei den Testlösungen von NaJ^{131} mit und ohne Trägerzusatz von Natriumjodid kam es zu deutlichen Aktivitätsmaxima, die entsprechend der Elektrophorese-Dauer über den Filterstreifen wanderten. Nach etwa 70 min Auftrennungsdauer war die Grenze des verwertbaren Wanderungsbereiches erreicht. Bei längerem Stromdurchgang war diese Jodidfraktion bereits aus dem sicher erfaßbaren Meßbereich hinausgewandert. Die Amplituden dieser Maxima (= Impulszahlen pro Minute) waren bei den Testlösungen mit Trägerjodid niedriger, als bei jenen ohne Zusatz. Wurde elementares Jod als Träger zugesetzt, so zeigte sich nach 10 min Stromdurchgang noch ein niedriger Aktivitätsgipfel über der Aufsatzstelle, nach 30 min Elektrophorese-Dauer war über dem ganzen Filterstreifen keine Aktivität mehr nachweisbar.

B. Tierversuche.

Hund I (trägerfreies Radio-Jodid): bis zu 3 Std nach der Gabe von trägerfreiem Radiojodid konnten im heparinisierten, venösen Vollblut außerordentlich hohe Aktivitäten gemessen werden, die innerhalb dieser Versuchszeit annähernd gleichförmig langsam abfielen. Erst nach der 3 Std-Grenze war während der folgenden Versuchszeit eine gewisse Konstanz der Teilchenzahlen im Blut zu beobachten. Die zuvor nahezu gleichmäßig „strahlende“ Schilddrüse zeigte 3 Std nach der Injektion eine deutliche Zunahme der Impulszahlen. Die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Blutproben wurde in je 4 Fraktionen vorgenommen: zwei Kurzzeitelektropherogramme (15 und 30 min Stromdurchgang) und zwei Langzeit-Auftrennungen (12 und 15 Std Stromdurchgang).

Bei den Blutproben bis zu 3 Std post inject. zeigte sich bei Kurzzeitentwicklung auf dem Filterstreifen ein markantes Aktivitätsmaximum weit außerhalb der Albuminfraktion. Ein Vergleich mit den Vorversuchen ergab eine gute Übereinstimmung mit der Wanderungsgeschwindigkeit von NaJ. Erst bei den Blutproben *nach* 3 Std post inject. trat ein neues Aktivitätsmaximum innerhalb der im Kurzzeitelektropherogramm noch nicht klar aufgetrennten Eiweißfraktionen auf. Die „Jodidphase“ außerhalb der Albuminfraktion war deutlich inaktiver geworden, in den folgenden Blutproben überhaupt fehlend. Bei Langzeitentwicklung konnten die Aktivitätsgipfel im Eiweißbereich stets unmittelbar neben der α_1 -Fraktion gefunden werden; die Jodidphase fehlte ebenso wie eine meßbare Aktivität über der Aufsatzstelle.

Hund II (Radioaktives Natriumjodid mit Trägerzusatz von NaJ): Bei gleichartiger Versuchsanordnung bildeten die Ergebnisse eine Parallele zu jenen bei Hund I. Die gemessenen Impulszahlen lagen aber in dieser Versuchsreihe tiefer, entsprechend der Aktivitäts-„Verdünnung“ durch Trägerzusatz. Auch bei diesem Tier wurde im Elektropherogramm zunächst lediglich eine Jodidphase gemessen, erst in den Proben nach 3 Std post inject. bildete sich ein im Eiweißbereich liegendes Aktivitätsmaximum aus. Nahezu spiegelbildlich mit der Impulszunahme dieser Aktivitätsphase ging die Teilchenzahl der Jodidphase zurück.

Hund III (Radioaktives NaJ^{131} mit Trägerzusatz von elementarem Jod in wäßriger Lösung): Trotz analog gleicher Menge von Jod wie bei Versuchshund II wurden im venösen Blut dieses Tieres von Anfang an wesentlich niedrigere Aktivitäten gefunden. Die Speicherung, über der Schilddrüse gemessen, setzte zeitlich früher ein und erreichte auch während der ganzen Versuchsdauer auffallend höhere Gipfel. Im Kurzzeitelektropherogramm war eine Jodidphase bis zu 3 Std nicht nachweisbar, dagegen ein kleinerer Aktivitätsgipfel an der Aufsatzstelle. Ein Vergleich mit den Vorversuchen zeigte eine gute Übereinstimmung mit jenen der Lösungen elementaren Jods. Nach Langzeit-Entwicklung dagegen trat schon nach 90 min post inject. ein deutlicher Impulsgipfel in der Eiweißfraktion auf. Auch dieses Maximum lag neben der α_1 -Fraktion. Beobachteten wir nun die Lage der Gipfelpunkte dieser Eiweißaktivität während der Versuchsdauer in kurvenmäßiger Darstellung, so war die *Kurvenform* bei allen drei Versuchstieren gleichartig. Lediglich der Kurvenanstieg war bei Tier III (elementares Jod) um 90 min *vorverschoben*.

Ein Vergleich der quantitativen Extinktionswerte aller Elektropherogramme führte zu keinen verwertbaren Unterschieden zwischen Albumin- bzw. Globulinfraktionen vor und nach Gabe der einzelnen Jodlösungen. Bei der geringen Zahl unserer Versuche und der relativ großen Streubreite der Methodik müssen die errechneten Eiweißveränderungen als nicht signifikant bezeichnet werden.

Besprechung der Ergebnisse.

Injiziert man eine Lösung von NaJ^{131} so wird bereits nach einmaliger Passage der Testlösung durch die Schilddrüse deren vorhandenes „Jodid-Depot“ mitmarkiert. Die zu diesem Zeitpunkt über dem Organ gemessene Strahlungsintensität ist daher im wesentlichen auf die bereits zu Versuchsbeginn in der Schilddrüse vorhandene Jodidmenge zu beziehen und nur zum geringsten Ausdruck einer zusätzlichen Speicherung von Jodid aus dem Injektionsmaterial. Für die Aktivität im venösen Blut gilt für die ersten Minuten nach der Injektion sinngemäß die gleiche Erklärung und bildet die bekannte Grundlage des 1. Teiles (Jodidphase) des sogenannten „Zwei-Phasen-Testes“ nach HORST. Nach Injektion von NaJ^{131} mit und ohne Trägerzusatz in unserer Versuchsanordnung überrascht aber die gemessene Aktivitätsmenge in der Venenblutprobe, die viel höher war, als es einer solchen Deutung zu diesem Zeitpunkt entsprechen würde. Erst nach etwa 2 Std waren die Teilchenzahlen abgesunken und ergaben in der Folgezeit Werte, die dem bekannten Kurvenverlauf der „Jodidphase“ entsprachen. Wir entnehmen daher den Ergebnissen unserer Versuche mit *trägerfreiem* NaJ^{131} , daß die normale Schilddrüse des Hundes nicht in der Lage zu sein scheint, selbst diese minimalen Spuren von zugeführtem Natriumjodid sofort an sich zu reißen und zu speichern. Aber auch die Versuche *mit* Zusatz von Träger-Jodid zeigten analoge Ergebnisse.

Anders dagegen lagen die Verhältnisse beim elementaren Jod (Hund III). Die schon frühzeitig hohen Impulzzahlen über der Schilddrüse und die niederen Werte im venösen Blut lassen an eine raschere Aufnahme von elementarem Jod in der Schilddrüse denken im Vergleich zum Jodid. Im Elektropherogramm hatten die Vorversuche gezeigt, daß wäßrige Lösung von radioaktiv markiertem elementarem Jod bereits nach 20 min Stromdurchgang sowohl von der Aufsatzstelle als auch von dem ganzen übrigen Streifen verschwunden war, offenbar von der Pufferlösung ausgewaschen wurde. Wenn nun im Tierversuch nach Gaben von freiem Radiojod nach Auftrennung ein Aktivitätsmaximum bei der α_1 -Fraktion zu messen war, so kann dies unter Umständen zweierlei Ursachen haben:

1. Das J_2 , das im elektrischen Feld nicht wandert, wurde adsorptiv der Eiweißfraktion angelagert.

2. Es handelt sich bei diesem Aktivitätsmaximum um eine organische Jod-Eiweißverbindung, wobei das Jod aus dem applizierten J_2 stammen muß.

Wir glaubten zur Klärung dieser Frage auf Dialyseversuche verzichten zu können, da die Lage dieses Impulsgipfels im Elektropherogramm nach den Gaben von elementarem Jod örtlich genau mit jenem nach Natrium-Jodid-Injektion übereinstimmte. Die Möglichkeit, daß sich das elementare Jod zufällig gerade *dieser* Eiweißfraktion adsorptiv angelagert hätte, bleibt zwar noch bestehen, erscheint aber außerordentlich

unwahrscheinlich. Auch die Veränderungen der Impulsamplituden, bezogen auf den Zeitpunkt der Applikation, waren beim elementaren Jod dieselben wie nach Jodidgaben. In Übereinstimmung mit MAURER u. Mitarb. möchten wir dieses Eiweiß-Aktivmaximum auf eine organische Jodverbindung (Tyrosin?) beziehen.

Zusammenfassung.

1. Es wird über tierexperimentelle Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion bei direktem Angebot (A. thyreoid. inf.) von verschiedenen anorganischen, radioaktiv markierten Jodformen berichtet. Die aus der Schilddrüsenvene entnommenen Blutproben werden auf Gesamtaktivität ausgemessen und anschließend der Elektrophorese mit verschiedener Entwicklungsdauer unterworfen.

2. Die Schilddrüse des Hundes scheint nach diesen Versuchen nicht in der Lage zu sein, selbst die unwägbaren Spuren einer Lösung von trägerfreiem NaJ^{131} sofort aus dem Blutstrom zu eliminieren und zu speichern. Erst nach neuerlicher (mehrfacher?) Passage der Testlösung durch die Schilddrüse mit dem Blutstrom kommt es zu einer deutlichen Aktivitätsabnahme im venösen Schenkel des thyreoidalen Blutkreislaufes.

3. Bis 3 Std post inject. einer NaJ -Lösung kann im Elektropherogramm eine Jodidphase nachgewiesen werden. Nach dieser Zeit tritt eine Aktivitätsphase neben der α_1 -Globulinfraction auf, die wir in Übereinstimmung mit MAURER als organische Jod-Eiweißverbindung deuten.

4. Nach Gabe von elementarem Jod wird diese Jodidphase vermißt, das angebotene Jod wesentlich schneller in der Schilddrüse gespeichert als gleiche Mengen von Jodid und schon vor der 3 Std-Grenze (90 min) eine gewanderte Jodfraktion im Elektropherogramm nachgewiesen.

5. Aus der, sowohl nach Jodid- als auch nach J_2 -Gabe gleichartigen Lage dieser jodhaltigen Fraktion im Elektropherogramm und dem gleichsinnigen Kurvenverlauf der gemessenen Aktivitäten wird geschlossen, daß es sich hierbei um eine organische Jodverbindung und nicht um eine zufällige, adsorptive Anlagerung des elementaren Jods an Eiweiß handelt.

Literatur.

HÄUSLER, H. PH., u. H. SIEDEK: *Cardiologia* (Basel) **22**, 1 (1953). — HOFMANN-CREDNER, D.: *Naturwissenschaften*, im Druck. — HORST, W.: *Klin. Wschr.* **1952**, 439. — MAURER, W., u. L. REICHENBACH: *Naturwissenschaften* **11**, 261 (1952).

Dr. D. HOFMANN-CREDNER, I. Med. Univ.-Klinik Wien/Österreich.

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Univ. Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. WEINIG).

Über die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholkonzentration beim Menschen.

Von

E. WEINIG und W. SCHWERD.

Mit 15 Textabbildungen.

(Eingegangen am 19. September 1953.)

Das Schrifttum über die Beziehungen zwischen Blutalkoholkonzentration und Urinalkoholkonzentration ist recht beträchtlich angewachsen. Die Auffassungen über diese Frage sind jedoch uneinheitlich und teilweise widersprechend. [Schrifttum siehe MILES, WIDMARK (2), ELBEL (2), CASIER und DELAUNOIS, RABINOWITCH.]

Neben Unterschieden in der Versuchsanordnung sind auch zweifellos methodische Fehler bei der Bestimmung des Urinalkoholgehaltes vorhanden, die das Bild verwirren. Insbesondere sind die Schlußfolgerungen von manchen Autoren deswegen nicht beweiskräftig, weil der Urin nach Destillation im sauren Milieu oder ohne Berücksichtigung der Reaktion im Destillat durch oxydimetrische Verfahren untersucht wurde. Nachdem HEILNER (1924) bei Alkoholbestimmungen im Harn mit der WIDMARK-Methode beobachtete, daß im Harn erhöhte Reduktionswerte auftreten können, auch wenn die Versuchspersonen keinen Alkohol genossen hatten und WIDMARK (2) klärend festgestellt hat, daß bei saurer Reaktion des Harnes flüchtige reduzierende Substanzen in erhöhter Menge in das Destillat übergehen können, hat ein großer Teil der früheren Arbeiten, bei denen dieser Umstand nicht berücksichtigt wurde, an Wert verloren. Hierzu gehören leider die umfangreichen und eingehenden Untersuchungen von MILES und die vor 1924 veröffentlichten Arbeiten von WIDMARK. Aber auch die Ergebnisse späterer Arbeiten sind aus diesem Grunde mit Vorbehalt aufzunehmen, worauf RABINOWITCH (1948) im Hinblick auf amerikanische Autoren hingewiesen hat.

Wegen der bisherigen Unklarheit über die Beziehungen zwischen der Alkoholkonzentration in Blut und Urin haben u. a. SCHWARZ, KIONKA u. HAUFE, HAUFE, JUNGMICHEL (2), KOOPMANN u. KEMPSKI, KAHANE, DERVILLÉE und WIDMARK davor gewarnt, bei der forensischen Beurteilung aus einer Urinalkoholkonzentration allein Rückschlüsse auf diejenige des Blutes zu ziehen.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die wesentlichen Einflüsse auf die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholkonzentration zu klären.

Die Alkoholausscheidung in der Niere.

Zunächst muß dazu Stellung genommen werden, welche Vorstellung wir uns über die Alkoholkonzentration des Nierenharnes zu machen haben. Daß der Alkohol in der Niere durch Diffusion ausgeschieden wird,

ist seit den mehrfach bestätigten Arbeiten WIDMARKS nicht mehr zweifelhaft. Über das Konzentrationsverhältnis zwischen Blut und *eben gebildetem* Harn liegen dagegen unseres Wissens bisher noch keine Untersuchungen vor.

Diese müßten, um jede durch zeitliche Verzögerung bedingte Konzentrationsverschiebung zu vermeiden, so durchgeführt werden, daß der in die Nierenkelche einfließende Harn untersucht würde, was schwer durchführbar wäre und nicht ohne einen störenden Einfluß auf die Nierentätigkeit sein dürfte. Dagegen hat WIDMARK (2) (S. 20) die Alkoholkonzentration des Ureterenharns — durch Freilegen der Ureteren — in Tierversuchen mit derjenigen des Blutes verglichen. Er konnte dabei feststellen, daß die Alkoholkonzentration des Ureterenharns in einem ziemlich konstanten Verhältnis zur Blutalkoholkonzentration steht. Die Ureterenharnalkoholwerte lagen bei $2\text{--}3\frac{0}{100}$ rund 20% über den Blutwerten. Da WIDMARK die Werte nicht von Versuchsbeginn bis Versuchsende verfolgte und nur einen relativ flach verlaufenden Abschnitt der Blutalkoholkurve herausgegriffen hat, ist nicht zu erkennen, inwieweit eine durch das Passieren des Nierenbeckens und des Ureters eingetretene zeitliche Verschiebung auf die Konzentrationsdifferenz einen Einfluß hat und ob immer eine feste Beziehung zwischen den Werten besteht.

Die Differenz zwischen dem Alkoholgehalt des Blutes und dem des Ureterenharns führte WIDMARK darauf zurück, daß bereits zwischen den beiden Phasen des Blutes (Blutkörperchen und Plasma) eine unterschiedliche Verteilung des Alkoholgehaltes in dem Sinne vorhanden sei, daß das Plasma einen höheren Gehalt aufweise. Hierauf hat zuerst MILES aufmerksam gemacht. Der Alkoholgehalt des Harnes wäre daher nach WIDMARK nicht mit jenem des Totalblutes, sondern am ehesten mit dem des Plasmas zu vergleichen.

Die Differenz zwischen dem Alkoholgehalt des Plasmas und dem der Blutkörperchen ist wohl im wesentlichen auf den unterschiedlichen Wassergehalt zurückzuführen. [Vgl. NICLOUX u. GOSSELIN, HARGER, HULPIEU u. LAMB, ELBEL (3), CASIER, THOMAS u. DELAUNOIS, VAN HECKE, HANDOVSKY u. THOMAS, PONSOLD u. a.] Die Verteilung des Alkohols zwischen Plasma (bzw. Serum) und Vollblut schwankt jedoch in relativ weiten Grenzen. MILES fand zwischen 10 und 30% höhere Werte im Plasma (Mittelwert etwa 20%), WIDMARK 10—21% (Mittel 15,5%), ELBEL (1) 5—25% (Mittel 17%), KÜNKELE 12—31% (Mittel 20%) HARGER, RANEY, BRIDWELL u. KITCHEL geben sogar Werte zwischen -7 und $+17\%$ (Mittel $+5\%$) an. RABINOWITCH weist dagegen auf einen Fall hin, bei welchem die Differenz zwischen Plasma und Vollblut 31% betrug. Von einer streng konstanten Beziehung zwischen der Alkoholkonzentration in Serum (bzw. Plasma) und Vollblut kann man daher nicht sprechen, wenngleich sich in der forensischen Praxis bei der Berechnung des Vollblutes aus dem Serumwert der von ELBEL (1) angegebene Umrechnungsfaktor von 1,2 allgemein eingebürgert hat (vgl. B. MUELLER, S. 753).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang das durch HAGGARD u. GREENBERG sowie durch HARGER, RANEY, BRIDWELL u. KITCHEL festgestellte Löslichkeitsverhältnis von Alkohol in Wasser, Blut und Urin, zu dessen Feststellung bekannte Mengen von Luft und Wasser, Blut oder Urin zusammen mit einer kleinen Menge Alkohol in ein geschlossenes Gefäß gebracht, in ein Wasserbad gestellt und bei konstanter Temperatur ins Gleichgewicht gebracht wurden. Die „relative Löslichkeit“ ist nach diesen Versuchen, unabhängig von der Temperatur, im Urin 14—16% höher als im Blut und im Wasser wiederum etwa 9% höher als im Urin.

Wir müssen also schon im *frisch bereiteten* Harn mit relativ großen Schwankungen gegenüber dem Alkoholgehalt des Vollblutes rechnen.

Nach unveröffentlichten eigenen Versuchen, bei denen wir alkoholhaltiges Blutserum ultrafiltrierten, ist der Alkoholgehalt zwischen Serum und Filtrat nicht nennenswert verschieden.

Die bei diesen Versuchen festgestellten Differenzen lagen meist noch im Fehlerbereich der Methode, wenngleich eine Tendenz zu geringfügig (um wenige Prozent) höheren Werten im Ultrafiltrat erkennbar war.

Jedoch ist damit zu rechnen, daß, wenigstens in der resorptiven Phase, der Alkoholgehalt des arteriellen Blutes sich von dem des venösen Blutes unterscheidet, worauf schon WIDMARK (2) (S. 37) hingewiesen hat. HARGER, HULPIEU u. COLE konnten an Hunden feststellen, daß die Alkoholkonzentration im Saphenablut erst 60 min nach der Verabreichung von 1—4 g Alkohol/kg gleich hoch wie im Herzblut war, 15 min nach der Alkoholaufnahme dagegen um 17% und 30 min danach noch 9% darunter lag. Bei Vergleichen zwischen Femoral- und Herzblut ergaben sich nach 15 min 12% und nach 30 min 11% Differenz. In Versuchen von HAGGARD u. GREENBERG war bei Hunden nach der Verabreichung von 3 g Alkohol/kg nach $\frac{1}{2}$ Std ein Verteilungskoeffizient zwischen arteriellem und venösem Blut von 0,47, nach 1 Std von 0,74 vorhanden und erst nach $1\frac{1}{2}$ Std erreichte der Koeffizient den Wert 1,0. Demnach ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das in die Nieren einströmende und der Harnbereitung dienende arterielle Blut in der resorptiven Phase einen höheren Alkoholgehalt aufweist als das zu einem Vergleich gleichzeitig herangezogene (Kubital-) Venenblut und daß daher die wahren Differenzen zwischen den Alkoholwerten von Blut und Harn nicht richtig erfaßt werden. Dies um so mehr, als nicht nur arterielles und venöses Blut in der Resorptionszeit differieren können, sondern auch im arteriellen Blut das Diffusionsgleichgewicht zwischen Plasma und Blutkörperchen sich noch nicht eingestellt hat, was nach in vivo- und in vitro-Versuchen von POLONOVSKI, LINDENBERG u. RABUSSIER erst nach 15—20 min eintritt. Schließlich kann durch die Aufnahme alkoholischer Getränke eine gewisse Blutverdünnung zustandekommen, die eine übermäßige Erhöhung des Serumalkoholgehaltes und damit des sich bildenden Harnes bedingen kann. Hierfür sprechen auch die Befunde von HARGER, RANEY, BRIDWELL u. KITCHEL bei Diabetes insipidus.

Obwohl also eine Reihe von Faktoren für die Größe der Alkoholkonzentration in dem sich bildenden Harn maßgebend ist, verfahren wir bei unseren weiteren Ausführungen zunächst einmal der Einfachheit halber so, als ob die Konzentration des *frisch bereiteten* Harnes 20% über der des Blutes läge.

Die Durchlässigkeit der Harnblasenwand für Alkohol.

Alle Autoren, mit Ausnahme von HAGGARD, GREENBERG, CARROLL u. MILLER und WEINIG u. SCHWERD, stehen auf dem Standpunkt, daß die Harnblasenwand für Alkohol erheblich durchlässig sei. Wäre sie in so erheblichem Maße durchlässig, wie dies allgemein angenommen wird, so müßten die Urinwerte weitgehend dem Serumalkoholgehalt gleichen, gleichgültig, ob die Harnblase häufig oder selten entleert wird. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie sich bei Durchsicht all derjenigen Arbeiten zeigt, die sich mit der Alkoholausscheidung im Harn befassen. Mitunter ergeben sich Urinwerte, die um ein Mehrfaches die Blutwerte übertreffen. WIDMARK (2) hat geglaubt, diese Beobachtungen auf fehlerhafte Bestimmungen durch Nichtalkalisieren des Urins bei der Destillation *reslos* zurückführen zu können. Er dachte dabei hauptsächlich an die Befunde von MILES, bei denen dies z. T. auch

zutreffen mag. Aber auch aus späteren Arbeiten und zahlreichen Einzelbeobachtungen, die auf analytisch richtigem Vorgehen beruhen, ergeben sich diese großen Differenzen zwischen Blut- und Urinwerten, ebenso wie wir sie in der forensischen Praxis trotz Alkalisierens des Urins nicht selten beobachten. Besonders eindrucksvoll ist der von JUNGMICHEL (1) beschriebene Fall, bei dem ein Mann nach einem Schädeltrauma noch etwa 12 Std gelebt hat. Bei der Sektion wurde eine prall gefüllte Harnblase vorgefunden, deren Urin (alkalisch) noch einen Alkoholgehalt von $2,25\%$ aufwies, während der Blutalkoholgehalt bereits auf den Nüchternwert von $0,04\%$ abgesunken war.

Bei systematischen experimentellen Untersuchungen in unserem Institut in den letzten Jahren konnten wir bei angehaltenem Blasenurin stets noch beträchtliche Alkoholkonzentrationen im Urin finden, selbst wenn der Blutalkoholgehalt schon mehrere Stunden vorher den Nüchternwert erreicht hatte. Hierbei war es nicht einmal Bedingung, daß der

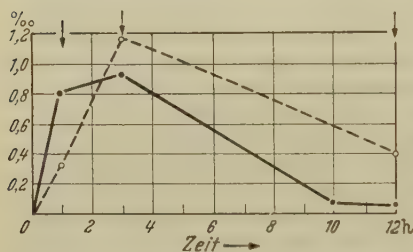


Abb. 1. Im angehaltenen Blasenharn noch $0,38\%$ Alkohol, während im Blut der Nüchternwert schon 2 Std zuvor erreicht wurde. (Dicke Linie: Blutalkohol, gestrichelte Linie: Harnalkohol, Pfeile: Blasenentleerungen.) (H. AMMON.)

Harn nach der letzten Alkoholaufnahme ständig angehalten worden war. Auch wenn im Maximum der Blutalkoholkonzentration oder in der postresorptiven Phase die Blase entleert und erst dann der Harn angehalten wurde, konnte diese Beobachtung gemacht werden. In Abb. 1 wird das Ergebnis eines derartigen Versuches wiedergegeben.

Wäre die Harnblase „mit großer Leichtigkeit und in erheblicher Ausdehnung für Alkohol durchlässig“, wie dies WIDMARK (2) behauptet hat,

so könnten solche Befunde nicht zustande kommen. Dies hat uns veranlaßt, das Absinken der Urinalkoholwerte nach abgeklungenem Blutalkoholspiegel systematisch zu verfolgen. (Versuche mit H. AMMON, HERING, SÖLLNER und S. AMMON.) Hierbei kamen wir, wie an anderer Stelle (WEINIG und SCHWERT) ausführlich dargelegt ist, zu dem Ergebnis, daß die normale menschliche Harnblasenwand unter physiologischen Verhältnissen (d. h. bei Urinwerten, wie sie nach Alkoholgenuß auftreten), wenn überhaupt, so nur in einem derart geringen Ausmaße durchlässig ist, daß praktisch von einer Undurchlässigkeit gesprochen werden kann.

Unsere Auffassung steht allerdings im Gegensatz zu derjenigen anderer Autoren [GAEBELIN, MORRO u. GAEBELIN, VÖLTZ, BAUDREXEL u. DIETRICH, NICLOUX u. NOWICKA, WIDMARK (2), LANDE, DERVILLÉE u. GODEAU, MORITZ u. JETTER u. a.], die ihre Untersuchungen an Tieren durchgeführt haben. Der Gegensatz mag teils dadurch bedingt sein, daß meist nicht unter physiologischen Bedingungen gearbeitet wurde und teils dadurch, daß sich möglicherweise die tierische Harnblase in dieser Hinsicht anders verhält als die menschliche.

*Die Beziehungen zwischen den Alkoholkonzentrationen in Blut
und Blasenurin.*

Die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholgehalt sind noch relativ gut übersichtlich, wenn der Harn aus einem Dauerkatheter abfließt oder in kurzen Abständen durch Miktion aus der Harnblase abgelassen wird (siehe Abb. 2).

Infolge einer zeitlichen Verschiebung um wenige Minuten, die durch das Passieren des Nierenbeckens und Harnleiters bedingt ist, liegen die Harnwerte zunächst unter den Blutwerten, überschneiden sie dann und liegen später über diesen. [Vgl. WIDMARK (2) (S. 23/24), JUNGMICHEL (1), KOOPMANN und KEMPSKI, ELBEL (3), PONSOLD (S. 414), LINCK und B. MUELLER (S. 775).] Bei einer Vergrößerung der Miktionsabstände

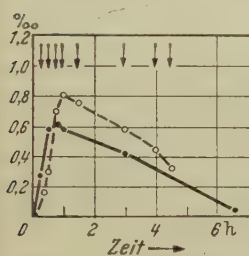


Abb. 2.

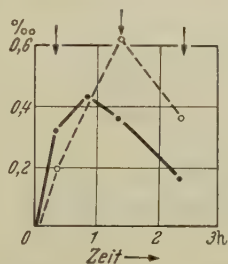


Abb. 3.

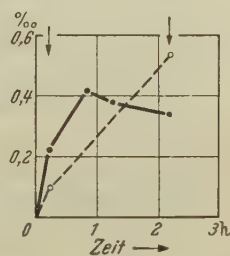


Abb. 4.

Abb. 2. Verlauf von Blut- und Harnalkoholkonzentration bei häufiger Entleerung der Harnblase. (Dicke Linie: Blutalkoholkonzentration, gestrichelte Linie: Urinalkoholkonzentration, Pfeile: Harnentleerungen.) (S. AMMON.)

Abb. 3 u. 4. Verlauf der Harnalkoholkonzentration (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Blutalkoholkurve (ausgezogene Linie) bei 1stündigem (Abb. 3) und 2stündigem Miktionsabstand (Abb. 4). Pfeile: Blasenentleerungen (BERGMANN).

(vermehrte Ansammlung des Urins in der Harnblase) findet die zeitliche Verschiebung einen stärkeren Ausdruck [vgl. eine entsprechende Abbildung bei WIDMARK (2) (S. 19)]. Systematisch wurde der Einfluß der Miktionsabstände auf den Verlauf der Urinalkoholkonzentration bisher nicht verfolgt. Lediglich MILES (S. 304) hat diese Frage in einer Versuchsserie mit gleichen Personen unter gleichen Bedingungen behandelt. Aus seinen Versuchen kann abgelesen werden, daß bei häufigerer Blasenentleerung die Urinwerte rascher ansteigen aber auch schneller wieder abfallen als bei seltenerer Miktion oder nur unvollständiger Entleerung.

Die Auswirkung der Vergrößerung der Miktionsabstände geht aus Abb. 3 und 4 hervor, die von der gleichen Versuchsperson, unter sonst gleichen Bedingungen, an verschiedenen Tagen gewonnen wurden. Der Miktionsabstand betrug einmal 1 Std (Abb. 3), das andere Mal 2 Std (Abb. 4).

Wollte man aus Kurven, die durch die Verbindung einzelner Harnalkoholkonzentrationspunkte entstanden sind (Abb. 3 und 4), Betracht-

tungen über die Höhe des Urinalkoholmaximums, den Zeitpunkt der Überschneidung und das sonstige Verhalten von Blut- und Urinalkoholkonzentration anstellen, so würde man grobe Fehlschlüsse ziehen. Ein Einblick in diese Verhältnisse wäre allenfalls dadurch zu gewinnen, daß bei eingelegtem Dauerkatheter, durch jeweilige Entnahme kleinster Proben, die laufende Alkoholkonzentration bestimmt würde. In dieser Weise ging KUGLER vor (Abb. 5), der jedoch nur in einstündigen Abständen die Harnalkoholkonzentration bestimmt hat. Um eine bei einem solchen Vorgehen zu befürchtende Gesundheitsschädigung zu vermeiden, kann man durch Zusammensetzen von Konzentrationspunkten des Harnalkohols aus zahlreichen Versuchen, die an verschiedenen Tagen, bei jeweiliger Änderung des Miktionszeitpunktes, gewonnen

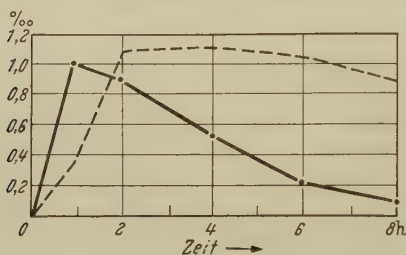


Abb. 5.

Abb. 5. Durch Probeentnahme mittels Dauerkatheter festgestellter Verlauf der Harnalkoholkurve (gestrichelte Linie) bei stehendem Blasenharn, im Vergleich zur Blutalkoholkurve (ausgezogene Linie) (nach KUGLER).

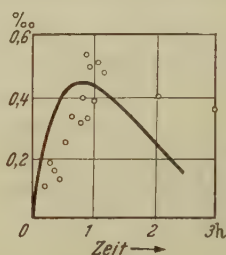


Abb. 6.

Abb. 6. Aus zahlreichen Versuchen, mit jeweils etwas verschobener Miktionszeit, zusammen-gestellte Konzentrationspunkte (Ringe) im Vergleich zur Blutalkoholkurve (ausgezogene Linie) als indirekte Möglichkeit der Ermittlung des Konzentrationsverlaufs im stehenden Blasenharn (BERGMANN).

werden, den Verlauf der Harnalkoholkurve ermitteln (vgl. Abb. 6). Hierbei ist erfahrungsgemäß mit erheblichen Streuungen zu rechnen. Prinzipiell ist dieser Weg jedoch gangbar (vgl. Abb. 5 mit 6).

Ähnlich wie es bei anderer Fragestellung BIEHLER, GEHLEN (vgl. auch CLARK) und DRUCKREY u. KÜPFMÜLLER zum Studium von Konzentrationsabläufen getan haben, ließen wir die Beziehung zwischen Blut- und Harnalkoholgehalt mathematisch behandeln, um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen¹.

Bei dieser Berechnung wurde von einem Kurvenverlauf des Blutalkoholspiegels ausgegangen, wie er sich in Abb. 7 darstellt, einem Kurventyp, der z. B. nach Alkoholaufnahme bei mäßig gefülltem Magen beobachtet werden kann und

¹ Dank dem Entgegenkommen des Vorstandes des Mathematischen Instituts der Universität Erlangen, Herrn Prof. Dr. NÖBELING, übernahm Herr Dr. BAUER diese Aufgabe, wofür wir ihm an dieser Stelle bestens danken. Die von ihm gewählte mathematische Behandlung ist an anderer Stelle (WEINIG u. SCHWERD) ausführlich dargestellt.

sich aus einer Parabel und einer abfallenden Geraden zusammensetzt. Der Konzentrationsverlauf wurde bei Annahme eines Restharnes von 10 ml und gleichbleibender Diurese von 50 ml/Std, eines Anstieges der Blutalkoholkonzentration auf 10/100 und einer Verteilung von Nierenharn- zu Vollblutalkoholkonzentration wie 1,2:1 berechnet. Die Harnblasenwand wurde als undurchlässig angenommen. Der errechnete Konzentrationsverlauf des Alkoholgehaltes im Blasenharn ist, wie sich bei der Gegenüberstellung von Abb. 5 und 6 mit Abb. 7 erkennen läßt, mit den Befunden bei Experimenten im Prinzip vergleichbar, wenn er auch im ganzen deutlich niedriger liegt und rascher abfällt als im Experiment. Diese Abweichung hat ihren Grund darin, daß zunächst bei den Berechnungen von einer gleichmäßigen Diurese von 50 ml/Std ausgegangen wurde, während durch den Alkoholgenuß meist, besonders im Maximum, ein erheblicher Diureseanstieg zustande kommt (vgl. EGGLETON).

Bei Unterstellung eines Restharnes von 10 ml, einer Ausgangsdiurese von 20 ml/Std und einem geradlinigen Anwachsen der Harnproduktion auf 150 ml/Std bis zum Zeitpunkt des Blutalkoholmaximums und gleichartigem Wiederabschwellen derselben bis zu dem Ausgangswert von 20 ml/Std wurden daher nochmalige Berechnungen angestellt, durch die sich ein Verlauf der Kurven ergab, wie ihn Abb. 8 zeigt.

Es ist klar zu erkennen, daß durch den vorübergehenden Diureseanstieg ein deutlich höherer Verlauf und ein langsames Absinken der Harnalkoholkonzentration zustande kommt.

In gleicher Weise wurde nunmehr der Einfluß einer einzelnen Blasenentleerung zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet. In Abb. 9 ist der Miktionszeitpunkt in der resorptiven Phase, in Abb. 10 im Maximum und in Abb. 11 in der postresorptiven Phase gewählt.

Bei der Betrachtung dieser Abbildungen ist sofort zu erkennen, daß bereits eine einzige Miktion nicht nur den augenblicklichen Verlauf der Blasenharnalkoholkurve, sondern das gesamte weitere Verhalten derselben bestimmt. Hierdurch erklärt sich auch, warum die Beziehungen zwischen Blut- und Harnalkoholkonzentration so schwer übersehbar sind, sobald eine oder mehrere Miktionen erfolgen. Besonders auffallend ist, daß — obwohl bei den Berechnungen nicht mit einer vollständigen Blasenentleerung gerechnet, sondern ein Restharn von 10 ml angenommen wurde — nach der Miktion in der resorptiven Phase die Blutalkoholkurve von der Harnalkoholkurve schon vor dem Maximum überschritten wird und daß sich ein höheres Harnalkoholmaximum ergibt.

Da es trotz gewisser Vereinfachungen in der mathematischen Behandlung der Frage zu zeitraubend gewesen wäre, noch weitere Möglichkeiten rechnerisch aufzuzeigen, wurden zur systematischen Darstellung der prinzipiellen Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholwerten *Modellversuche* angestellt und deren Ergebnisse mit experimentell gefundenen Blut- und Harnalkoholwerten in Vergleich gebracht.

Den Verlauf einer Blutalkoholkurve im Modellversuch nachzuahmen, gelingt unschwer durch kontinuierliches Anreichern einer Flüssigkeit mit Alkohol bzw. durch fortlaufendes Verdünnen nach dem Erreichen einer gewissen maximalen Konzentration. Selbstverständlich können aber bei solchen Versuchen an Stelle des Alkohols andere leicht wasserlösliche Stoffe, wie etwa Farbstoffe oder Säuren,

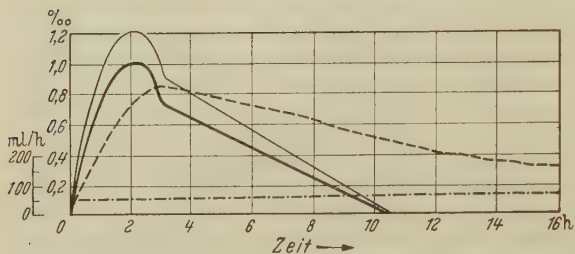


Abb. 7. Verlauf der Alkoholkonzentration in der Harnblase (gestrichelte Linie) bei gleichmäßiger Diurese (50 ml/Std) auf Grund von Berechnungen (Dr. BAUER). Dicke Linie: Blutalkoholkonzentration, dünne Linie: Nierenharnalkoholkonzentration.

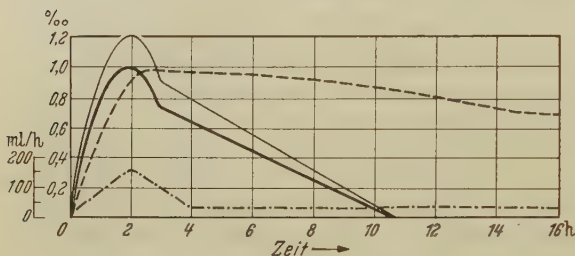


Abb. 8. Verlauf der Blasen-
harnalkoholkonzentration (gestrichelte Linie) bei Zunahme der Diurese bis zum Maximum der Blutalkoholkonzentration (strichpunkt-
tierte Linie) auf Grund von Berechnungen (Dr. BAUER). Dicke Linie: Blutalkoholkonzentration, dünne Linie: Nierenharnalkoholkonzentration.

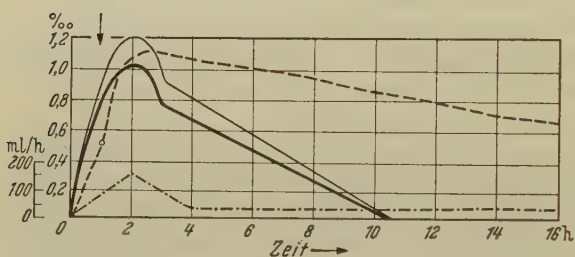


Abb. 9. (Erklärung unten.)

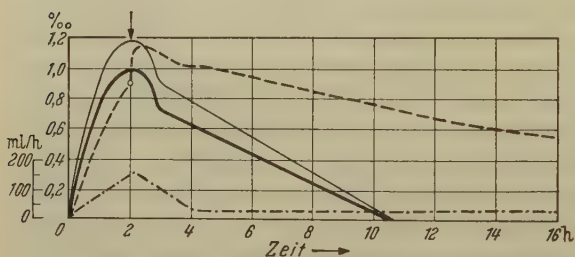


Abb. 10. (Erklärung unten.)

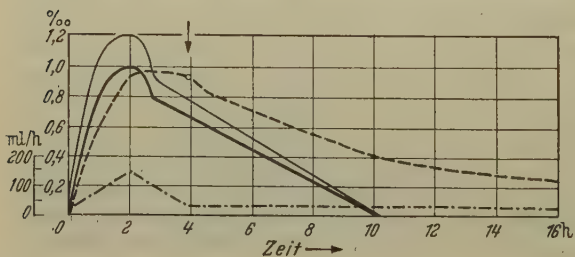


Abb. 11.

Abb. 9–11. Wie Abb. 8; jedoch Blasenentleerungen zu verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 9: in der resorptiven Phase, Abb. 10: im Maximum, Abb. 11: in der post-resorptiven Phase).

verwendet werden. Wir haben der Vereinfachung halber Schwefelsäure genommen, deren Konzentration sich unvergleichlich viel rascher (acidimetrisch) als die des Alkohols bestimmen läßt. Ebenso wie bei der mathematischen Betrachtung unterstellten wir wiederum zur Vereinfachung ein festes Verhältnis zwischen den Konzentrationen des Blutes und des in der Niere frisch gebildeten Harns von 1:1,2. Dementsprechend wurde eine Lösung hergestellt, die den Nierenharn darstellen sollte und aus welcher der in seiner Konzentration wechselnde Harn in ein Glasgefäß lief, das eine undurchlässige Harnblase repräsentierte. Die „*Blutkurve*“ wurde aus derjenigen des „*Nierenharns*“ durch Verminderung derselben um 20% zeichnerisch festgelegt und nur die erstere wird der Übersichtlichkeit wegen in den folgenden Zeichnungen mit der „*Blasen-harnkonzentration*“ in Beziehung gebracht.

Im einzelnen wurde folgendermaßen (Abb. 12) vorgegangen: Aus einem Standgefäß *A* mit Niveauregler ließen wir eine $n/10$ H_2SO_4 -Lösung in ein Gefäß *B* tropfen, in welchem sich 250 ml Wasser befanden. Der Inhalt von *B*, zunächst also eine H_2SO_4 -Lösung steigender Konzentration, tropfte mit gleicher Geschwindigkeit in ein weiteres Gefäß *C* ab, so daß in *B* das Ausgangsvolumen von 250 ml konstant gehalten

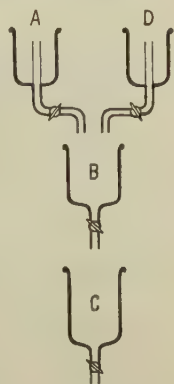


Abb. 12. Modell zur acidimetrischen Ermittlung der Konzentration einer in Gefäß *C* („Harnblase“) sich ansammelnden Flüssigkeit, die aus Gefäß *B* („Niere“) abtropft. Durch Zufließen einer verdünnten H_2SO_4 aus *A* steigt die Konzentration in *B* zunächst an, durchläuft ein Maximum und sinkt dann durch Wasserzufuhr aus *D* — bei gleichzeitigem Unterbrechen der Säurezufuhr aus *A* — wieder ab.

wurde. Nachdem die Konzentration der H_2SO_4 in *B* rasch angestiegen war, wurde die H_2SO_4 -Zufuhr aus *A* unterbrochen und aus einem Gefäß *D* mit verringerter Tropfenzahl Wasser in das Gefäß *B* hineingetropt und auch die Tropfenzahl von *B* nach *C* entsprechend verringert. Die Tropfenzahl wurde mit Hilfe eines Metronoms geregelt und die Flüssigkeiten in *B* und *C* wurden laufend mit Rührwerken durchmischt. Die Konzentrationen in den Gefäßen *B* und *C* wurden fortlaufend acidimetrisch bestimmt. Die Mischung in *B* entsprach somit der Alkoholkonzentration des frisch bereiteten Nierenharns, während diejenige in *C* die Blasen-harnkonzentration darstellte. Der Verlauf der „Nierenharnkonzentration“ wurde so eingestellt, daß nach steilem Anstieg ein Maximum erreicht wurde und dann ein langsamer Abfall zustande kam. Der absteigende Ast der Kurve verlief zwar nicht ganz geradlinig, war jedoch so wenig gekrümmt, daß die Gesamtkurve etwa den Verlauf einer Blutalkoholkurve hatte. Eine Entleerung des Inhaltes von *C* entsprach einer vollständigen Blasenentleerung.

Der Vorteil dieser Modellversuche besteht darin, daß die Konzentrationsänderungen dieses „Blasen-harnes“ nicht nur im abgelassenen „Harn“ festgestellt werden können, sondern daß man gewissermaßen in der Harnblase — bei unserem Modell in Gefäß *C* — die Konzentrationsänderungen durch kleinste Probeentnahmen (1 ml) beliebig oft verfolgen kann.

Von den Ergebnissen dieser *Modellversuche* seien aus Raumersparnisgründen nur wenige graphisch dargestellt (Abb. 13a—15a). Weitere Möglichkeiten lassen sich hieraus ableiten.

Auffallend ist die *Sprunghaftigkeit* der Konzentrationsänderung in Gefäß *C* („Harnblase“) unmittelbar nach Entleerung des Gefäßes

(„Blasenentleerung“) (Abb. 14a), die darin begründet ist, daß (im übertragenen Sinne) der direkt nach der Blasenentleerung in die Blase einfließende Harn, von einer geringfügigen zeitlichen Verschiebung abgesehen, der Konzentration des frisch bereiteten Harnes (Nierenharn) entspricht, die (wenigstens im Modell) 20% über der Blutkonzentration liegt. Mit zunehmendem Abstand der Blasenentleerungen vergrößern sich die

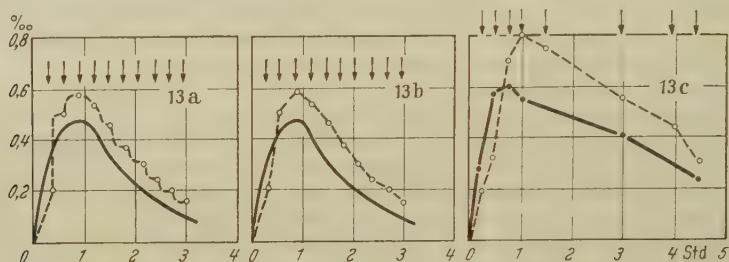


Abb. 13.

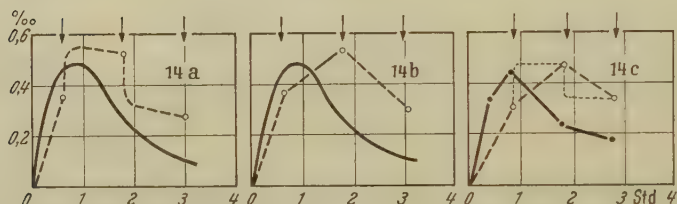


Abb. 14.

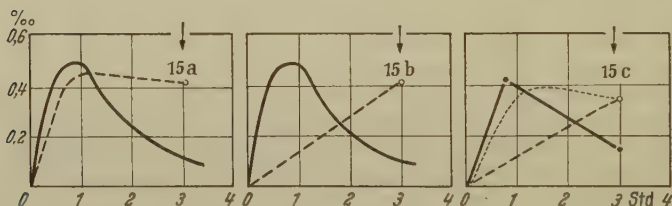


Abb. 15.

Abb. 13—15. Reihe a. Verlauf der Blasenharnalkoholkonzentration im Vergleich zur Blutalkoholkonzentration in *Modellversuchen* mit verschieden häufiger Entleerung der „Harnblase“. Dicke Linie: Blutalkoholkonzentration, gestrichelte Linie: Blasenharnalkoholkonzentration, Pfeile: Blasenentleerungen. — Reihe b. *Scheinbarer Verlauf* der Alkoholkonzentration bei gerader Verbindung der zur Zeit der Blasenentleerung bestehenden Konzentrationen. — Reihe c. Zum Vergleich herangezogene *Versuche am Menschen* mit entsprechenden Miktionszeiten. Punktierter Linie: Vermutlicher Verlauf der Blasenharnalkoholkonzentration.

Stufen, die durch die eintretenden Konzentrationsänderungen hervorgerufen werden. Das eigenartige Abweichen der beiden Kurven voneinander ist also im wesentlichen ein Effekt des Ansammelns von in wechselndem (zunehmenden bzw. abnehmenden) Maße alkoholhaltigem Urin. Je häufiger die Entleerungen sind, desto mehr nähert sich das Kurvenbild

dem des Nieren- bzw. Ureterenharns, je seltener, desto stärker wird die Abweichung.

Verbindet man aber, wie dies in Abb. 13b—15b getan wurde, nur die Konzentrationen miteinander, die zum jeweiligen Zeitpunkt der Miktion (Entleerung des Gefäßes *C*) bestehen, so wird dadurch deutlich gemacht, daß das entstehende Kurvenbild für die Blasenharnkonzentration um so mehr von den wirklichen Verhältnissen abweicht, je größer die zeitlichen Abstände zwischen den Miktionen sind (vgl. Abb. 15b mit 15a). Derartige fehlerhafte Kurvenbilder haben vielfach in der Literatur falsche Vorstellungen veranlaßt.

In den Abb. 13c—15c sind *experimentell gefundene Ergebnisse* mit ähnlichen Miktionszeiten bzw. -abständen zum Vergleich herangezogen worden¹. Dabei zeigt es sich, daß die durch Experimente gewonnenen Kurvenbilder nicht nur im Verlauf, sondern — wenigstens bei den Versuchen 14c und 15c — auch hinsichtlich der relativen Differenzen zwischen Blut- und Blasenharnkonzentration mit den Modellversuchen recht gut übereinstimmen. Dagegen stieg bei dem in Abb. 13c dargestellten Versuch die Harnalkoholkonzentration stärker an als es nach den Modellversuchen zu erwarten gewesen wäre.

Sofern die Urinalalkoholkonzentration deutlich weniger als 20% über der Blutalkoholkonzentration lag, war in allen Fällen die Überschneidung von Blut- und Harnkurve erst kurz vorher erfolgt. Der relativ späteste Zeitpunkt der Überschneidung beider Kurven liegt kurze Zeit nach dem Maximum des Blutalkoholspiegels. Rein zeitlich gesehen ist der äußerste Fall für die Überschneidung dann gegeben, wenn die Harnblase bis dahin nicht entleert wird und außerdem alkoholfreier Restharn vor Trinkbeginn vorhanden ist. Je größer die Menge des alkoholfreien Restharnes ist, desto stärker ist der Einfluß dieses Faktors, wobei nicht so sehr die absolute wie die relative Größe im Vergleich zu der während der Alkoholbeeinflussung gebildeten Harnmenge von Bedeutung ist. Diese Frage dürfte jedoch in der Praxis deswegen kaum eine Rolle spielen, weil im allgemeinen — worauf schon BAVIS u. ARNHOLT hingewiesen haben — durch die alkoholbedingte Diurese mindestens dann alsbald ein Harndrang zustande kommen wird, wenn bereits ein größeres Ausgangsvolumen vorhanden ist.

Bei den folgenden Betrachtungen ist noch auf weitere Besonderheiten einzugehen, die in praktischen Fällen, abweichend von den Gegebenheiten, wie sie sich im Modellversuch darstellen, vorkommen können.

In der *resorptiven Phase* kam bei den Modellversuchen jeweils nach der ersten Miktion die Überschneidung zustande. Wir können aber praktischen Versuchen entnehmen, daß einerseits die Überschneidung der beiden Kurven bereits in der resorptiven Phase erfolgen kann, ohne daß in diesem Zeitraum eine Miktion stattfand und daß andererseits, trotz mehrmaliger Blasenentleerungen, die Überschnei-

¹ Abb. 13c entstammt der Inaug.-Diss. von S. AMMON, Abb. 14c u. 15c der Inaug.-Diss. von G. BERGMANN.

dung erst im Maximumbereich (vgl. z. B. Abb. 13c) zustande kam. Diese Abweichungen können dadurch bedingt sein, daß

1. die zeitliche Verschiebung, die sich infolge des Durchlaufens der Wegstrecke von Niere über Nierenbecken, Harnleiter bis zur Harnblase ergibt, eine größere ist als im Modellversuch,

2. die Verteilung zwischen Blut und Harn eine andere ist als 1:1,2, wie wir sie in unseren Betrachtungen am Modellversuch zugrundelegten.

Diese Einflüsse können in beiden Richtungen wirksam werden, indem sie den Überschneidungszeitpunkt früher oder später zustande kommen lassen. Ferner sind sie aber auch eng verknüpft mit der Frage des *Einflusses der Diurese* auf die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalkoholwerten. Die allgemeine Meinung geht zwar dahin, daß die Diurese praktisch keinen Einfluß auf die Alkoholkonzentration im Harn habe, was auf eine Arbeit von WIDMARK (1) zurückgeht, die sich jedoch lediglich mit der Frage des *Überganges* des Alkohols in den Harn in der Niere befaßte. Eine Übertragung dieser Ansicht auf den Blasenharn mußte jedoch zu irrümlichen Vorstellungen Anlaß geben. Allein die Betrachtung der Abb. 7 und 8 beweist, daß die Änderung der Diurese auf den Konzentrationsablauf des angehaltenen Blasenharnes einen wesentlichen Einfluß hat.

Der *Einfluß der Diurese* auf das Absinken des Harnalkoholgehaltes in der Blase geht besonders deutlich aus den in der Inaug.-Diss. von SÖLLNER niedergelegten Versuchen hervor, wobei in Reihenversuchen, nach Injektion des diuresefördernden Deriphyllins, ein deutlich rascheres, nach Injektion des diuresehemmenden Tonephins dagegen ein wesentlich langsames Absinken der Blasenharnalkoholkonzentration nachzuweisen war als bei Versuchen, in denen eine medikamentöse Beeinflussung nicht erfolgte. Untersucht wurde jeweils das Verhalten der Alkoholkonzentration im angehaltenen Harn nach abgesunkenem Blutalkoholspiegel, wenn also nur alkoholfreier Harn von der Niere her nachfließen konnte.

Über den Einfluß der *Durchlaufsgeschwindigkeit* des Harnes durch die Niere und Ureter ist zu sagen, daß mit der Verkürzung der Durchlaufszeit auch eine frühere Überschneidung der Blut- und Harnalkoholkurve zustande kommen muß, bzw. umgekehrt. Ein weiterer Grund für eine Abweichung des Experimentes vom Modellversuch hinsichtlich der Überschneidung von Blut- und Urinalkoholkurve in der *resorptiven Phase* liegt in der weiter oben begründeten Annahme, daß der *Alkoholgehalt von Vollblut zu Plasma* bzw. Serum (demgemäß Vollblut zu Nierenharn) sich nicht immer wie 1:1,2 verhält. Aus den Untersuchungen der verschiedenen Autoren geht hervor, daß 1. die Verteilung des Alkohols im Blut in weiten Grenzen schwankt, 2. das Diffusionsgleichgewicht sowohl zwischen arteriellem und venösem Blut als auch 3. zwischen Blutkörperchen und Plasma in der Resorptionsphase unter Umständen noch nicht eingetreten ist und 4. eine Erhöhung des Wassergehaltes bei reichlicher Aufnahme verdünnter alkoholischer Getränke (z. B. Bier) eine relative Erhöhung des Serumalkoholgehaltes bedingen kann. Unsere Annahme wird durch zahlreiche Versuchsergebnisse von HERING gestützt, der nach Aufnahme von 3 Flaschen Bockbier (1½ Liter) innerhalb von 30 min jeweils schon 50 min nach Beendigung des Trinkens bei der ersten Blasenentleerung (noch vor dem Blutmaximum) stets höhere Harnwerte als Blutwerte nachweisen konnte.

Dementsprechend war auch *im Maximum* sehr häufig ein stärkeres Ansteigen der Harnwerte über die des Blutes zu beobachten, wo bis zu 40% höhere Harnwerte festzustellen waren.

Auch die schon kurz erwähnte Möglichkeit, daß erst in der *postresorptiven Phase* die Überschneidung der Werte stattfindet, war durch praktische Versuche zu bestätigen. Im allgemeinen werden zwar, insbesondere dann, wenn eine Harnentleerung vorangegangen ist, die Urinwerte diejenigen des Blutes überschreiten, doch können im Beginn der postresorptiven Phase — entgegen der bisher gültigen Ansicht — die Blut- und Urinwerte, auch trotz vorangegangener Miktion, sich decken oder die Urinwerte sogar unter denen des Blutes liegen. Dies ist aber selten der Fall.

Je länger der Harn über das Maximum der Blutalkoholkurve hinaus angehalten wird, desto mehr vergrößert sich nach einer Überschneidung die Differenz zwischen den Blut- und Harnwerten. Diese Feststellung unterstreicht unsere Ansicht, daß die *Harnblasenwand für Alkohol nicht nennenswert durchlässig* sein kann. Das Absinken des Alkoholgehaltes in der postresorptiven Phase und besonders auch in dem Stadium, in welchem im Blut kein erhöhter Alkoholspiegel mehr nachzuweisen ist, kann allein dadurch erklärt werden, daß vermindert alkoholhaltiger, bzw. schließlich alkoholfreier Harn in die Blase gelangt und die vorhandene Konzentration je nach der Größe der Diurese mehr oder weniger rasch absinkt.

Ein relativ gleichmäßiges Absinken der Harnalkoholkonzentration, vergleichbar etwa dem des Blutes, kann man daher überhaupt nicht erwarten. Wird der Urin in der postresorptiven Phase angehalten, so sinkt die Alkoholkonzentration langsamer als die des Blutes ab; wird die Blase entleert, so sinkt die Konzentration rascher ab, ohne die des Blutes zu erreichen. Rückschlüsse von dem Alkoholgehalt eines durch Miktion gewonnenen Harns auf den Harnalkoholgehalt oder gar den Blutalkoholgehalt zu einem früheren Zeitpunkt können aus all diesen Gründen nicht mit hinreichender Sicherheit gemacht werden.

Unsere Versuche widerlegen ferner die von LINCK geäußerte Ansicht, daß in der Ausscheidungsperiode der Urinalalkoholgehalt den maximalen Blutalkoholgehalt nur unterschreiten und selbst im günstigsten Falle nicht ganz erreichen könne. Gegen Ende des postresorptiven Teils der Blutalkoholkurve können zwar nach unserer Erfahrung bei angehaltenem Harn die Harnwerte nicht höher sein als der Maximalwert des Blutes; unter Umständen können sie nahezu gleich hoch sein wie dieser. Dagegen sind oft, insbesondere im Maximum und im Anfangsteil der postresorptiven Phase, wesentlich höhere Harnwerte zu beobachten.

Zusammenfassung.

Auf Grund von systematischen Untersuchungen am Menschen, mathematischen Berechnungen und Modellversuchen hat sich ergeben, daß eine Vielzahl von Faktoren die Beziehungen zwischen Blut- und Urinalalkoholkonzentration bestimmt und sehr wechselhaft gestalten kann.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch das Grundsätzliche in diesen Beziehungen weitgehend geklärt werden.

Besonders hervorzuheben ist, daß sich im praktischen Versuch fehlerhafte Kurven dann ergeben, wenn lediglich die Alkoholkonzentrationspunkte solcher Urinproben miteinander verbunden werden, die durch einzelne Miktionen gewonnen wurden. Dies ist wohl einer der Hauptgründe für manche ungenauen Vorstellungen auf diesem Gebiet.

Literatur.

- AMMON, H.: Über das Rückresorptionsvermögen der Harnblasenwand für Alkohol. Inaug.-Diss. Erlangen 1950. — AMMON, S.: Inaug.-Diss. Erlangen (in Vorbereitung). — BAVIS, D. F., and M. F. ARNHOLT: Nebraska State Med. J. **23**, 407 (1938). — BERGMANN, G.: Vergleichende Blut- und Urinalkoholuntersuchungen zur Bestimmung des Verlaufes der Blutalkoholkurve. Inaug.-Diss. Erlangen 1951. — BIEHLER, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **107**, 20 (1925). — CASIER, H., et A. L. DELAUNOIS: L'intoxication par l'alcool éthylique. Paris 1947. — CASIER, H., F. THOMAS u. A. L. DELAUNOIS: Arch. internat. Pharmacodynamie **69**, 186 (1945). Ref.: Quart. J. Stud. Alc. **7**, 310 (1946/47). — CLARK, A. J.: General Pharmacology. Heffter-Heubners Handb. d. exper. Pharmacol., Erg.-Bd. 4, Berlin 1937. — DERVILÉE, P.: Ann. Méd. lég. etc. **16**, 598 (1936). — DRUCKREY, H., u. K. KÜPFMÜLLER: Die Pharmazie. 8. Beih., 1. Erg.-Bd. Berlin 1949. — EGGLETON, M. G.: J. of Physiol. **101**, 172 (1942). — ELBEL, H.: (1) Dtsch. Z. gerichtl. Med. **25**, 124 (1935). — (2) Die wissenschaftlichen Grundlagen der Beurteilung von Blutalkoholbefunden. Leipzig 1937. — (3) Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, S. 40. Berlin 1940. — (4) Med. Welt **1951**, 1106, 1151. — GAEBELIN, R.: Über das Resorptionsvermögen der Harnblase. Inaug.-Diss. Halle 1894. — GEHLEN, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **171**, 541 (1933). — HAGGARD, H. W., and L. A. GREENBERG: J. of Pharmacol. **52**, 167 (1934). — HAGGARD, H. W., L. A. GREENBERG, R. P. CARROL and D. P. MILLER: J. Amer. Med. Ass. **115**, 1680 (1940). — HARGER, R. N., H. R. HULPIEU and V. V. COLE: Fed. Proc. **4**, 123 (1945). Ref.: Quart. J. Stud. Alc. **6**, 384 (1945). — HARGER, R. N., H. R. HULPIEU and E. B. LAMB: J. of Biol. Chem. **120**, 689 (1937). — HARGER, R. N., B. B. RANEY, E. G. BRIDWELL and M. F. KITCHEL: J. of Biol. Chem. **183**, 197 (1950). — HAUFE, M.: Über das Verhalten des Alkohols im Harn. Pharmacol. Beitr. zur Alkoholfrage. Jena 1928. — HEILNER, E.: Münch. med. Wschr. **1924**, 1422. — VAN HECKE, W., H. HANDOVSKY et F. THOMAS: Ann. Méd. lég. etc. **31**, 291 (1951). — HERING, G.: Das Resorptionsvermögen der Harnblasenwand für Alkohol unter verschiedenen Harnausscheidungsbedingungen. Inaug.-Diss. Erlangen 1952. — JUNGMICHEL, G.: (1) Dtsch. Z. gerichtl. Med. **21**, 463 (1933). — (2) Referatbemerkung: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **27**, 227 (1937). — KAHANE, E.: Ann. Méd. lég. etc. **16**, 399 (1936). — KIONKA, H., u. M. HAUFE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **128**, 150 (1928). — KOOPMANN, H., u. H. KEMPSKI: Münch. med. Wschr. **1937**, 780. — KUGLER, H.: Vergleichende Alkoholbestimmung im menschlichen Blut und Urin. Inaug.-Diss. Leipzig 1935. — KÜNKELE, F.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **26**, 241 (1936). — LANDE, P., P. DERVILÉE et J. GODEAU: Ann. Méd. lég. etc. **17**, 11 (1937). — LINCK, K.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **39**, 514 (1949). — MILES, W. R.: J. of Pharmacol. **20**, 265 (1922). — MORITZ, A. R., and W. W. JETTER: Arch. of Path. **33**, 939 (1942). — MORRO, W., u. R. GAEBELIN: Z. klin. Med. **32**, 12 (1897). — MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — NICLOUX, M., et G. GOSSELIN: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)

16, 338 (1934); zit. nach CASIER u. DELAUNOIS. — NICLOUX, M., et V. NOWICKA: J. Physiol. et Path. gén. **15**, 297 (1913). — POLONOVSKI, M., B. A. LINDENBERG et H. RABUSSIER: C. r. Acad. Sci. (Paris) **232**, 1595 (1951). Ref.: Quart. J. Stud. Alc. **13**, 300 (1952). — PONSOLD, A.: Lehrbuch der gerichtl. Medizin. Stuttgart 1950. — RABINOWITCH, I. M.: J. of Crim. Law Criminol. **39**, 225 (1948). — SCHWARZ, F.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **10**, 377 (1927). — SÖLLNER, F. M.: Über das Resorptionsvermögen der Harnblase für Alkohol. Inaug.-Diss. Erlangen 1952. — VÖLTZ, W., A. BAUDREXEL u. W. DIETRICH: Arch. f. Physiol. **145**, 186 (1912). — WEINIG, E., u. W. SCHWERD: Hoppe-Seyler's Z. **295**, 197 (1953), K. THOMAS-Festschrift. — WIDMARK, E. M. P.: (1) Arch. f. Physiol. **33**, 85 (1915). — (2) Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-medizinischen Alkoholbestimmung. Berlin, Wien 1932.

Prof. Dr. Dr. E. WEINIG,

Inst. f. gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Univ. Erlangen.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. SCHULEMANN).

Über das steuerbare Meerschweinchenasthma.

II. Mitteilung: Versuche mit Acetylcholin.

Von

HANS FRIEBEL und HANS FLICK.

(Eingegangen am 23. Oktober 1953.)

I. Verlauf des Asthmaanfalls.

Über das steuerbare Asthma beim Meerschweinchen haben FRIEBEL u. BASOLD bereits in einer früheren Veröffentlichung berichtet. Die Asthmaanfälle wurden durch Histamin und spezifische Antigene ausgelöst. In dieser zweiten Arbeit wird zunächst eine Arbeitsweise angegeben, nach der man mit Acetylcholin langdauernde und in ihrem Verlauf steuerbare Asthmaanfälle hervorrufen kann. Anschließend werden Ergebnisse der vergleichenden Prüfung einiger Arzneimittel besprochen.

Über den experimentell mit Acetylcholin hervorgerufenen Krampf der Bronchialmuskulatur berichtete FOGGIE bereits 1937. Seine Versuchstiere waren Ratten. Zur gleichen Zeit führten KALLÓS u. PAGEL ähnliche Versuche am Meerschweinchen durch. Auch SIDERIUS arbeitete mit Meerschweinchen. Weiterhin hat DANIELOPOLU bei Kaninchen das Bild des asthmatischen Anfalls durch die Injektion von Acetylcholin in die Trachea hervorgerufen. Bei diesen Versuchen sind relativ kurzdauernde dyspnoische Anfälle zustande gekommen.

Wir erwarteten, daß man unter Verwendung unserer beim Histamin- und allergischen Asthma angewandten Technik auch mit Acetylcholin längerdauernde Asthmaanfälle hervorrufen könne, die klinisch symptomatisch dem Asthmaanfall des Menschen ähnlich sind.

Die Versuche wurden in dem schon früher beschriebenen Gerät durchgeführt (FRIEBEL u. BASOLD). Acetylcholinhydrochlorid „Merck“ wurde im Exsiccator verwahrt. Die Lösungen wurden täglich frisch hergestellt. Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Meerschweinchen des Handels mit einem Gewicht zwischen 300 und 450 g. Kleinere, noch nicht erwachsene Tiere eignen sich nicht zu diesen Versuchen, insbesondere nicht zur später beschriebenen Arzneimittelprüfung. Tiere aus verschiedenen Zuchten stimmen in ihrem Reaktionsvermögen auf Acetylcholin und die Arzneimittel nicht immer völlig überein. Wir haben nach Möglichkeit gleichartiges Tiermaterial verwandt. Kein Tier kam häufiger als einmal in der Woche in den Versuch. Tierhaltung im Freien, keine besondere Diät.

Bei der Durchführung der Versuche hielten wir uns weitgehend an die Regeln, welche sich beim Histaminasthma bewährt haben. Geringe Abweichungen werden später besprochen.

Bei der *Einleitung des Anfalls* durch ein kräftig wirkendes Acetylcholinaerosol (M/40) und beigemischtes Wasseraerosol traten die ersten

Zeichen des beginnenden Asthmaanfalls gewöhnlich schon nach 1 min auf. Tiere, die nach etwa 8 min noch kein Asthma hatten, wurden ausgesondert. Auch mit Nebeln aus weniger konzentrierten Acetylcholinlösungen kann man Asthmaanfälle auslösen, aber mit zunehmender Verdünnung verlängert sich die Zeit bis zum Beginn des Anfalls, und die Zahl der Tiere, welche kein Asthma bekommen, nimmt zu. Meerschweinchen, bei denen der Asthmaanfall zögernd in Gang kommt, können sich im weiteren Verlauf des Versuches trotzdem als recht empfindlich gegen Acetylcholin erweisen.

Mit 1/40 molarer Acetylcholinlösung ließ sich der Asthmaanfall mit so großer Regelmäßigkeit auslösen wie z. B. mit 1/200 molarer Histaminlösung das Histaminasthma (FRIEBEL 1). Bei 250 Versuchen sahen wir nur wenige Ausnahmen. Diese betrafen im wesentlichen Tiere, die schon mehrmals in wöchentlichen Abständen im Versuch gewesen waren. Allerdings führen wiederholte Asthmaanfälle nicht generell zu einer geringeren Reaktionsbereitschaft. Wir fanden in solchen Fällen auch mehrfach eine verstärkte Asthmabereitschaft. Im ganzen ergaben sich also nach mehreren Asthmaanfällen zunehmend Abweichungen von der Regel nach beiden Seiten.

Bei der Einleitung des Anfalls wurde zugleich mit den ersten Asthmanzeichen die Aerosolzufuhr abgebrochen. Der Übergang von der Normalatmung zur typischen Asthmaatmung beim Beginn des Acetylcholinasthmas trat früher auf als beim Histamin- und allergischen Asthma (FRIEBEL 1). Die Dyspnoe steigerte sich in wenigen Sekunden zur schweren Atemnot. Bei dieser ersten heftigen Reaktion auf die Acetylcholinverabreichung scheinen die Versuchstiere stärker gefährdet zu sein als im initialen Anfall beim Histaminasthma, der protrahierter verläuft. Da das Acetylcholinasthma aber sehr schnell abklingt, lassen sich Todesfälle an Erstickung im Rahmen der hier beschriebenen Arbeitsweise leichter vermeiden als beim Histamin- und beim allergischen Asthma. Das Asthma verschwand nach Überschreiten des Höhepunktes regelmäßig innerhalb von 3 min vollkommen.

Das Wesentliche unserer Arbeitsweise, der *langdauernde Anfall von gleichbleibender Stärke*, wurde wie beim Histaminasthma durch die nachfolgende Inhalation von kleinen Acetylcholinmengen erhalten. In dieser Versuchsphase ließen wir ein Aerosol inhalieren, das aus einer M/200 Acetylcholinlösung entwickelt wurde und dem — wie bei der Einleitung des Anfalls — ein gleichartiger Wassernebel beigemischt wurde. 2 Faktoren bestimmten den Verlauf des langdauernden Anfalls im wesentlichen:

1. Die Schwere des initialen Anfalls.
2. Der Zeitpunkt des Wiederbeginns der Acetylcholin-Inhalation nach dem Überschreiten des initialen Höhepunktes.

Zu 1. Der Beginn des Anfalls läßt sich leichter oder schwerer gestalten, je nachdem die Acetylcholinzufuhr früher oder später unterbrochen wird. Eine sehr schwere Dyspnoe in der ersten Phase des Anfalls wirkt sich auf den ganzen folgenden Anfallsverlauf erschwerend aus. So kann man schon durch die Gestaltung der ersten Phase den Verlauf des später folgenden langdauernden Asthmas vorbereiten.

Zu 2. Der Zeitpunkt der Neuzufuhr des weniger konzentrierten Acetylcholins ist insofern von Bedeutung, als ein zu frühes Einsetzen der Zweitinhalation ein im ganzen schweres Asthma und ein zu spätes Einsetzen ein leichtes Asthma bedingt. Bei zu frühem Einsetzen verläuft der Anfall nicht nur im ganzen schwerer, die Dyspnoe wird darüber hinaus häufig wieder zunehmen. In solchen Fällen kann man ein relativ gleichbleibendes Asthma nur dann erhalten, wenn man die Nebelzuführung zum Inhalatorium abermals unterbricht und nach etwas stärkerem Abklingen der Dyspnoe noch einmal mit der Inhalation von M/200 Acetylcholin beginnt. Geringfügige Abweichungen vom gleichbleibenden Asthmaanfall können manchmal schon ausgeglichen werden, wenn der Einstrom des Aerosols zum Inhalatorium gedrosselt wird. Auf diese Weise kann man es in der Regel erreichen, daß die Asthmaerscheinungen ohne weitere Korrektur über 20 min relativ konstant bleiben.

Die Atemnot beim Acetylcholinasthma ist, wenn es konstant bleibt, im allgemeinen schwerer als beim langdauernden Histamin- und allergischen Asthma. Bei Versuchen, durch weniger konzentrierte Acetylcholingaben das Asthma leichter zu gestalten, erlebten wir oft, daß die Dyspnoe der Meerschweinchen 5—30 min nach Beginn des Anfalls wieder nachließ.

Aber auch die für langdauernde Anfälle erforderliche schwerere Form des Acetylcholinasthmas nimmt häufiger keinen so gleichbleibenden Verlauf, wie wir es vom Histamin- und allergischen Asthma her kennen. Das langdauernde Acetylcholinasthma läßt sich gewöhnlich nicht über 60 min lang gleichmäßig erhalten. Bei den schweren Verlaufsformen kommt es ganz allmählich zu einer stärker werdenden Dyspnoe, die zwar in den ersten 20 min kaum auffällt, dann aber doch in den meisten Fällen deutlich wird. Ein 10 min dauernder Probelauf, wie er sich beim Histaminasthma bewährt hatte, reicht demnach beim Acetylcholinasthma nicht aus, um eine Vorhersage über den Verlauf des Anfalls in den folgenden 50 min abzugeben. Das Acetylcholinasthma läßt sich selbst dann, wenn man größere Übung hat, meistens nicht so gleichbleibend gestalten, wie die beiden anderen Asthmaformen. Dieser Nachteil ist allerdings nicht schwerwiegend. Anfälle, die von Beginn an etwas schwerer verlaufen als das „mittelschwere“ Histamin- oder allergische Asthma (FRIEBEL 1), werden bei längerer Dauer des Anfalls nicht leichter, sondern noch schwerer. Unter diesen Umständen kann man bei der Verwendung dieser Asthmaform zur Arzneimitteltastung die Zeit des Probelaufs von 10 min auf etwa 5—6 min verkürzen. Nach unseren bisherigen Erfahrungen an etwa 250 derartigen Asthmaanfällen wird die Prüfung von Arzneimitteln durch ein langsames Zunehmen der Atemnot nicht gestört. Das durch Acetylcholin bedingte Asthma läßt sich durchaus soweit

konstant erhalten, daß es zur Arzneimittelpfprüfung im Anfall geeignet ist. Die Lenkung dieser Anfälle erfordert allerdings mehr Übung und Erfahrung als beim Histamin- und allergischen Asthma.

II. Über die Beeinflussung des Acetylcholinasthmas durch Arzneimittel.

Der durch Acetylcholin ausgelöste und unterhaltene Asthmaanfall läßt sich durch Antihistaminkörper, Atropin und verwandte Arzneimittel und außerdem durch Sympathicomimetica erleichtern oder beseitigen. Über die vergleichende Prüfung dieser Stoffe wird im Folgenden berichtet.

Methode. Alle Medikamente wurden als Aerosol verabreicht. Ihre Wirkung wurde in gleicher Weise wie beim Histaminasthma (FRIEBEL 2) ausgetestet, d. h. es wurde diejenige Arzneimitteldosierung ermittelt, die gerade noch ausreichte, um bei 5 von 5 Meerschweinchen innerhalb von längstens 40 min das Asthma völlig zu beseitigen. Sie wurde als Grenzwert bezeichnet. Wenn die Arzneimittelmenge im Aerosol so stark herabgesetzt worden war, daß eins oder mehrere von 5 Meerschweinchen das Asthma nicht mehr verloren, wurde die vernebelte Lösung als unwirksam bezeichnet.

Ergebnisse. Der Grenzwert des *Atropins* wurde mit einer M/128000 Lösung erreicht. Dieses erste Ergebnis unserer Arzneimitteluntersuchun-

Tabelle 1.

Chemische Bezeichnung	Handelsbezeichnung	Grenzkonzentration gegenüber M/200 Acetylcholinlösung
	Atropin	M/128000
Xanthen-9-carbonsäure- β -diäthylamino-äthylester Brommethylat	Banthine, MTB Brunnengräber	M/16000
[(Phenothiazinyl-10')-1-propyl-2]-N-trimethylammonium Methylsulfat .	Multergan, Padisal	M/4000
Scopolamin-N-butylbromid	Buscopan	M/2000
3-(1-Piperidyl)-1-phenyl-1-cyclohexyl-1-propanol Hydrochlorid	Artane	M/500
Diäthylaminoäthylester der Phenyl-cyclopentancarbonsäure	Parpanit	M/250
N-Benzyl-N-phenyl-4-amino-1-methylpiperidin	Soventol	M/200
α -N-(β -Diäthylaminoäthyl)-amino-phenylessigsäure-isoamylester	Avacan	M/250 unwirksam
Phenyl-(1-piperidino)-essigsäure- β -diäthylaminoäthylester Dichlorhydrat.	Spasmo-Papamid	M/100 unwirksam

gen am Acetylcholinasthma ließ sich bei einer 6 Monate später erfolgenden Nachprüfung reproduzieren. Eine so kräftige Wirkung, wie sie Atropin auf das durch Acetylcholin bedingte Asthma ausübt, haben wir bei keinem anderen Medikament beobachtet. Tab. 1, in der Atropin und eine Reihe sonstiger Arzneimittel mit atropinähnlichen Eigenschaften zusammengestellt sind, gibt einen Überblick über die jeweils zur Broncholyse erforderlichen Grenzkonzentrationen.

Antihistaminkörper hatten eine nur schwache oder auch nicht nachweisbare Wirkung auf das Acetylcholinasthma. Die Grenzkonzentration für Atosil und Soventol lag bei M/200. Andere Antihistaminkörper (Pyribenzamin, Allercur, Dabylen, Thephorin) hatten eine noch geringere und mit unserem Verfahren nicht meßbare Wirkung. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 den früher beim Histaminasthma ermittelten Werten (FRIEBEL 2) gegenübergestellt.

Tabelle 2.

Medikament ¹	Antiacetylcholinwirkung (M/200 Acetylcholin)	Antihistaminwirkung (M/1000 Histamin)
Pyribenzamin.	M/100 unwirksam	M/8000
Allercur	M/100 unwirksam	M/2000
Atosil	M/200	M/2000
Dabylen	M/100 unwirksam	M/1000
Soventol	M/200	M/2000
Thephorin	M/100 unwirksam	M/2000

¹ Wegen der chemischen Struktur und anderer Warenzeichen für die gleichen Substanzen vgl. Tab. 1 (S. 268) der folgenden Arbeit.

Vergleich der Grenzkonzentrationen einiger Antihistaminkörper beim Acetylcholinasthma und Histaminasthma.

Bei der Prüfung von *Adrenalin* und dem sympathicomimetischen Amin Isopropyl-nor-adrenalin war es nicht leicht bzw. unmöglich, den Grenzwert zu bestimmen. Die einzelnen Testergebnisse sind in Tab. 3 und 4 zusammengestellt.

Mit Adrenalin konnte bei keiner der von uns geprüften Lösungen das Asthma *regelmäßig* beseitigt werden. Im Bereich von M/1000 bis M/16000 wird man das Maximum der antiasthmatischen Adrenalinwirkung suchen müssen. Bei höheren Verdünnungen als M/16000 war die Arzneiwirkung eindeutig zu schwach. Bei der Verwendung von M/500 und noch konzentrierteren Lösungen verschlechterten sich die Ergebnisse erheblich; bei einem Teil der Meerschweinchen wurde das Asthma sogar schwerer. In diesen Fällen nahmen die Anfälle folgenden Verlauf: In den ersten 2 min nach Medikamentverabreichung trat eine deutliche Besserung des Asthmas ein. Die Atmung wurde frequenter und tiefer. Dann setzte allmählich wieder eine Zunahme der Dyspnoe ein; schließlich wurde das Asthma

Tabelle 3. *Adrenalin bei Acetylcholinasthma.*

Vers. Nr.	M/500	M/1000	M/2000	M/4000	M/8000	M/16000	M/32000
1	— / —	— / —	— / —	$\frac{1}{3}$ / 5	1 / 7	$\frac{1}{2}$ / 15	1 / 8
2	$1\frac{1}{2}$ / —	1 / 7	— / —	— / —	2 / 9	$\frac{1}{2}$ / 17	2 / —
3	2 / —	1 / 5	1 / 10	$\frac{1}{2}$ / 5	— / —	$\frac{1}{2}$ / 4	— / —
4	2 / —	1 / 9	1 / 10	$1\frac{1}{2}$ / —	1 / 8	— / —	— / —
5	1 / —	1 / 8	1 / 8	1 / 8	1 / 5	4 / —	— / —

Bestimmung des Grenzwertes bei der Adrenalinzuführung durch Aerosol. Die vernebelten Lösungen enthalten Adrenalin in Konzentrationen von M/500 bis M/32000. Der links vom Schrägstrich stehende Wert unter jeder Konzentration gibt die Zeit bis zum Beginn der Wirkung, der rechte Wert bis zur vollen Wirkung in Minuten wieder. Eine volle Arzneiwirkung wird mit keiner Konzentration bei 5 von 5 geprüften Tieren erhalten.

Tabelle 4. *Isopropyl-nor-adrenalin beim Acetylcholinasthma.*

Vers. Nr.	M/50	M/100	M/500	M/1000	M/2000	M/4000	M/8000	M/16000
1	1 / —	1 / —	$\frac{1}{2}$ / 5	1 / 12	1 / 10	$1\frac{1}{2}$ / 15	$\frac{1}{2}$ / 2	3 / 30
2	1 / 12	2 / 20	1 / 16	1 / 9	1 / 10	2 / 15	1 / 16	2 / —
3	1 / —	1 / —	— / —	$1\frac{1}{2}$ / —	1 / 8	1 / 8	1 / 9	2 / 12
4	1 / —	$\frac{1}{2}$ / —	1 / —	1 / 10	2 / 10	1 / 9	1 / 8	— / —
5	1 / —	2 / 15	$\frac{3}{4}$ / 10	1 / 10	1 / —	1 / 12	2 / —	1 / 8
6		4 / 15	1 / —					
7		1 / —						
8		1 / —						
9		2 / —						

Bestimmung des Grenzwertes bei der Isopropyl-nor-adrenalin-Zuführung wie in Tab. 3. Der Grenzwert liegt bei M/4000.

schnell schwerer und mußte gewöhnlich etwa 20 min nach Beginn der Adrenalininhalation unterbrochen werden, um die Meerschweinchen vor dem Erstickungstod zu bewahren. Bei der Prüfung von Isopropyl-nor-adrenalin konnte der Grenzwert bei M/4000 bestimmt werden. Im übrigen ergaben sich im wesentlichen ähnliche Ergebnisse wie beim Adrenalin (Tab. 4).

Pendiomid, Hexamethonium, Stoffe mit ganglienblockierender Wirkung, können — selbst wenn sie aus hochprozentigen Lösungen (M/100) vernebelt werden — das durch Acetylcholin bedingte Asthma nicht beseitigen.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Prüfung der spasmolytischen Wirkung von Stoffen mit atropin-ähnlichen Eigenschaften zeitigte ein unerwartetes Ergebnis. Nach Angabe von CUNNINGHAM und nach persönlichen Mitteilungen von AMANN erwarteten wir, daß z. B. Artane 10—50% der spasmolytischen Wirkung

von Atropin habe. Die von CUNNINGHAM am isolierten Intestinalsegment, von AMANN am Doryl-erregten isolierten Darm und von uns am Mäuseauge durchgeführten Versuche führten zu dieser Vermutung. Beim Acetylcholinbronchospasmus mußte Artane aber etwa 200fach höher dosiert werden als Atropin. Atropin hat demnach im Vergleich zu Artane bei der Verwendung unserer Versuchsanordnung eine viel stärkere spasmolytische Wirkung, als am isolierten Organ nachgewiesen wurde. Folgt man den Angaben von EICHHOLTZ, nach denen im Zustand der Vagotonie (auch der durch Erregungsmittel des Parasympathicus hervorgerufenen Vagotonie) eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Atropin besteht, so darf man folgern, daß unser Testverfahren die Bedingung der Sensibilisierung des Parasympathicus erfüllt, während isolierte Organe hierfür nicht geeignet sind. Substanzen, die nur am vagotonisch reagierenden Tier ihre volle Wirkung gegenüber Acetylcholin zur Geltung bringen können, werden im Vergleich zu anderen weniger differenziert wirkenden Mitteln bei der Verwendung von einfacheren Arbeitsmodellen unterbewertet werden. Wir glauben daher, daß das Acetylcholinasthma die Untersuchungsmethoden am isolierten Organ sinnvoll ergänzt, wenn Substanzen mit atropinähnlicher Wirkung geprüft werden.

Vergleicht man die Wirkung einiger Antihistaminkörper am Histaminasthma mit ihrer Wirkung am Acetylcholinasthma, so kommt ihre Antihistaminspezifität klar zum Ausdruck. Übereinstimmend mit HAAS fanden wir, daß Atosil und Soventol eine vergleichsweise zu anderen Antihistaminkörpern kräftige Antiacetylcholinwirkung haben, Dabylen eine schwächere. Auch MEIER und BUCHER und außerdem SCHILD und REUSE (zit. nach HAAS) fanden bei Untersuchungen am isolierten Meer-schweinchendarm, daß Atosil unter den bekannten Antihistaminkörpern die stärkste Wirkung gegenüber Acetylcholin entfaltet.

Auffallend war, daß die Bestimmung der Grenzkonzentration von Adrenalin nur unvollkommen gelang. Die Verstärkung der Atemnot nach der Inhalation adrenalinreicher Nebel läßt an eine Überlagerung der bronchospastisch bedingten Dyspnoe durch ein adrenalinbedingtes Lungenödem denken. Derartige Zustände kann man auch beim Histaminasthma hervorrufen. Das Ausbleiben der Broncholyse nach geringeren Adrenalinmengen kann hierdurch aber nicht erklärt werden, zumal das histaminbedingte Asthma durch z. B. M/400 Adrenalin regelmäßig beseitigt werden kann.

Bei der Durchsicht der Literatur fanden wir eine Reihe von Hinweisen auf eine Verstärkung der Acetylcholinwirkung durch Adrenalin und Isopropyl-nor-adrenalin. BÜLBRING u. BURN sowie KONZETT geben an, daß die nicotinartige Wirkung des Acetylcholins durch kleine Adrenalindosen gefördert werden kann. W. M. BENSON konnte mit Hilfe der WARBURG-Methode eine Hemmung der Cholinesterase durch Adrenalin nachweisen. THER u. MEHMKE versuchten, den Wirkungsmechanismus inverser Adrenalinwirkungen durch den physiko-chemischen Vorgang an der Ober-

fläche der Zellen zu erklären. Ob eine oder mehrere dieser Angaben zur Erklärung der von uns beobachteten mangelhaften Adrenalinwirkung auf das Acetylcholinasthma herangezogen werden darf, läßt sich bis jetzt nicht entscheiden.

Eine vergleichbare Parallele zu unseren Beobachtungen fanden wir in einer Veröffentlichung von GRAUBNER u. WICK. Sie arbeiteten mit der Methode von KONZETT u. RÖSSLE und erzeugten beim Hund acetylcholinbedingte Bronchialkrämpfe. Bei hochempfindlicher Registrierung und Vagusausschaltung beobachteten sie eine Verstärkung der spastischen Acetylcholinwirkung nach Aludrinverabreichung. Derselbe Effekt konnte auch mit Cardiazol erreicht werden. Die Autoren nehmen an, daß das Aludrin in dieser Versuchsanordnung nicht nur den Bronchospasmus erleichtert, sondern auch eine Weckwirkung ausübt. Die Weckwirkung und die dadurch bedingte Erschwerung des Bronchospasmus werden zur Erklärung der inversen Aludrinwirkung herangezogen. Bei unseren Versuchen haben wir mit nichtnarkotisierten Tieren gearbeitet. Auch wir sahen manchmal einen ähnlichen Effekt durch Aludrin, wie ihn GRAUBNER u. WICK beschrieben haben. Wir halten es für möglich, daß das Zusammenwirken von Acetylcholin und Adrenalin bei den Versuchen von GRAUBNER u. WICK und bei unseren eigenen Versuchen die gleiche Ursache hat. Die Weckwirkung des Aludrins kann dann allerdings nicht zur Erklärung herangezogen werden.

Stoffe mit ganglienblockierender Wirkung beeinflussen das Acetylcholinasthma nicht. Der durch Acetylcholin bedingte Krampf der Bronchialmuskulatur dürfte in erster Linie durch die lokale Einwirkung des inhalierten Acetylcholins auf den postganglionären Anteil der musculo-neuralen Funktionseinheit zustande kommen.

Das Acetylcholinasthma ist demnach zur Prüfung von Arzneimitteln geeignet, die ihre spasmolytische Wirkung im Bereich der Bronchialmuskulatur ausüben. Hierher gehören vor allem Atropin und ähnlich wirkende synthetische oder halbsynthetische Substanzen. Es ist weiterhin geeignet, atropinartige Wirkungskomponenten in Stoffen mit andersartiger Wirkungsspezifität sichtbar zu machen.

Zusammenfassung.

Es wird über eine Arbeitsmethode berichtet, die es ermöglicht, mit Acetylcholin beim Meerschweinchen längerdauernde Asthmaanfälle zu erhalten. Während des Anfalls können Arzneimittel geprüft werden. Die Prüfungsergebnisse machen vorwiegend die atropinähnliche Wirkung oder Wirkungskomponente der Mittel kenntlich. Über die vergleichende Prüfung von Atropin, Banthine, Padisal, Buscopan, Artane, Parpanit, Avacan und Spasmo-Papavid wird berichtet. Weiterhin wurden von den Antihistaminkörpern Pyribenzamin, Allercur, Atosil, Dabylen, Soventol, Thephorin untersucht; außerdem Adrenalin und Isopropyl-nor-adrenalin, Pendiomid und Hexamethoniumbromid. In dieser Versuchsanordnung wird die Wirkung des Atropins von keiner der übrigen Substanzen erreicht. Der Wirkungsunterschied gegenüber ähnlich wirkenden Mitteln kommt stärker zum Ausdruck als bei der Prüfung am isolierten Darm.

Literatur.

- BENSON, W. M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 598 (1948). — BÜLBRING, E., u. J. H. BURN: J. of Physiol. **101**, 289 (1942). — CUNNINGHAM, R. W., B. K. HARNED, M. C. CLARK, R. R. COSGROVE, N. S. DAUGHERTY, C. H. HINE, R. E. VESSEY u. N. N. YUDA: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 151 (1949). — DANIEL-OPOLU, D.: Phylaxie — Paraphylaxie et Maladies spécifiques. S. 263. Paris: Masson 1946. — EICHHOLTZ, F.: Lehrbuch der Pharmakologie, 7. Auflage. Berlin: Springer 1951. — FRIEBEL, H., u. A. BASOLD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 13 (1953). — FRIEBEL, H.: (1) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 21 (1953); (2) **217**, 35 (1953). — FOGGIE, P.: Quart. J. Exper. Physiol. **26**, 225 (1937). — GRAUBNER, W., u. H. WICK: Arch. internat. Pharmacodynamie **1950** LXXXIV, No. 2—3. — HAAS, H.: Histamin und Antihistamin II. Aulendorf: Cantor 1952. — KALLÓS, P., u. W. PAGEL: Act med. scand. (Stockh.) **91**, 292 (1937). — KONZETT, H.: Helvet. physiol. Acta **8**, 245 (1950). — MEIER, R., u. K. BUCHER: Progress in Allergy, Bd. II, S. 291. Basel: Karger 1949. — SIDERIUS, P.: Acta physiol. et pharmacol. Neerl. (Amsterd.) **2**, 546 (1951/52). — THER, L., u. S. MEHMKE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **204**, 414 (1947).

Dr. HANS FRIEBEL, Pharmakologisches Institut der Universität Bonn.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. SCHULEMANN).

Über die Steigerung der broncholytischen Wirkung des Adrenalins durch einige Aralkylamine.

Von

HANS FRIEBEL und HANS FLICK.

(Eingegangen am 23. Oktober 1953.)

In einer früheren Arbeit berichtete FRIEBEL (1) über die Beobachtung, daß die gleichzeitige Inhalation von Butyl-nor-adrenalin und Allercur eine unerwartet günstige broncholytische Wirkung zur Folge habe. Wenn man beide Substanzen gleichzeitig verabfolgt, reicht $\frac{1}{16}$ der von den Einzelsubstanzen erforderlichen Arzneimittelmenge aus, um einen durch Allergen oder Histamin unterhaltenen Asthmaanfall zu beseitigen. Das Ausmaß der Zunahme ist so erheblich, daß diese beim experimentellen Meerschweinchenasthma gefundenen Verhältnisse für die klinische Nachprüfung interessant sein dürften. Auch für Adrenalin, wie für einige seiner Verwandten konnten wir nachweisen, daß ihre broncholytische Wirkung durch gleichzeitige Inhalation von Allercur erheblich gesteigert werden kann, worüber im einzelnen erst später berichtet werden soll.

Weiterhin haben wir geprüft, ob neben dem Allercur auch andere Aralkylamine geeignet sind, bei gleichzeitiger Verabreichung mit einem sympathicomimetischen Amin eine wesentliche Steigerung der broncholytischen Wirkung herbeizuführen. Über diese Versuche wird im folgenden berichtet.

Methodik.

Alle Versuche wurden an Meerschweinchen durchgeführt, die mit Eiweiß sensibilisiert worden waren. Vorbehandlung mit 2 Einzelinjektionen von je 0,5 ml einer 20%igen Lösung von Hühnereiweiß in physiologischer Kochsalzlösung im Abstand von 2 Tagen. Erste Asthmaversuche 6 Wochen nach der ersten sensibilisierenden Injektion. Diese Arbeitstechnik entsprach im Prinzip früher gemachten Angaben (FRIEBEL 2), ist im einzelnen aber insofern modifiziert worden, als 1. die sensibilisierende Antigeninjektion wiederholt wurde, 2. ein anderer Tierstamm verwandt wurde. Von diesen Tieren läßt sich ein höherer Prozentsatz mit Erfolg sensibilisieren und die Sensibilisierung ist durchschnittlich stärker ausgeprägt. (Züchter: STEIN, Sieglar bei Bonn.)

Alle Arzneimittel wurden ausschließlich als Aerosol zugeführt. Als sympathicomimetischen Bronchodilatator verwandten wir Suprarenin „Hoechst“ aus handelsüblichen Ampullen. Die sonstigen Arzneimittel wurden in dest. Wasser gelöst und in dieser Form verabreicht. Die dem Adrenalin zur Wirkungssteigerung beigemischten Substanzen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Ergebnisse.

Über die broncholytische Wirkung von Pyribenzamin, Allereur, Dabylen und Adrenalin beim allergischen Asthma ist in einer vorangegangenen Veröffentlichung schon berichtet worden (FRIEBEL 3).

Bei diesen früheren Therapieversuchen am experimentellen Asthma hatten wir zum Teil Meerschweinchen benutzt, deren Sensibilisierung bedeutend schwächer ausgeprägt war, als die der jetzt verwendeten Tiere. Im Verlauf ausgedehnter Versuche hatten wir die Erfahrung gemacht, daß einzelne der schwächer sensibilisierten Meerschweinchen im Verlauf einer einstündigen Allergen-Inhalation ihr Asthma verlieren. Eignet sich ein derartiges Vorkommnis während der Austestung von Arzneimittelwirkungen, so ist eine Fehlbeurteilung der Arzneimittelwirkung unvermeidlich, denn das Verschwinden des Anfalls wird in solchen Fällen fälschlich der Arzneimittelwirkung zugeschrieben. Um derartige Fehler zu vermeiden, haben wir die Arbeitsmethode in der beschriebenen Weise modifiziert und die schon früher geprüften Substanzen erneut ausgetestet.

Tabelle 1.

Chemische Bezeichnung	Handelsname	Hauptwirkung
N'-Benzyl-N'-(2-pyridyl)-N,N-dimethyl-äthylendiamin	Pyribenzamin	
N-Benzyl-N-phenyl-4-amino-1-methyl-piperidin	Soventol	
3-p-Chlorbenzyl-2-pyrrolidin-methylenbenzimidazol	Allereur	
3-p-Chlorbenzyl-2-pyrrolidin-methylenbenzimidazol Jodmethylat.		Histamin-antagonisten
Benzhydryl-β-dimethyl-amino-äthyläther.	Dabylen (Benadryl)	
1-Phenyl-4-methyl-3,4,5,6-tetrahydro-pyridinden	Thephorin	
N-(β-dimethyl-amino-propyl)-phenothiazin.	Atosil (Phenergan)	
N-(β-Diäthyl-amino-äthyl)-phenothiazin.	Casantin (Diparcol)	
N-(3-Dimethylamino)-propyl-3-chlor-phenothiazin.	Megaphen (Rp 4560)	stoffwechsel-senkend
N,N,N',N',3-Pentamethyl-N,N'-diäthyl-3-aza-pentylen-(1,5)-diammonium-dibromat	Pendiomid	ganglio-plegisch
4-Aminobenzoessäure-diäthylamino-äthylester	Procain	
4-Amino-5-Oxybenzoessäure-dimethyl-amino-äthylester	Oxyprocain	
P-Amino-N-(2-diäthylamino-äthyl)-benzamid	Procainamid	Lokal-anästhetika
4-Amino-5-oxy-N-(2-dimethylamino-äthyl)-benzamid	Oxyprocainamid	

Der Grenzwert für Adrenalin wurde bei M/4000 bestimmt, der für Allercur bei M/1000. Pyribenzamin, Dabylen und auch alle übrigen untersuchten Substanzen konnten selbst bei der Inhalation substanzreicher Arzneimittelnebel keine Beseitigung des allergischen Asthmaanfalls herbeiführen. Die Verwendung von 1/100 molaren Lösungen beseitigte, wenn überhaupt, das Asthma nur bei einzelnen Tieren.

Eine Steigerung der broncholytischen Wirkung von Adrenalin durch einen der übrigen Stoffe trat ein, wenn die Konzentration der wirkungssteigernden Aralkylamine in der vernebelten Lösung stärker als die des Adrenalins war. In jedem Falle stellten wir zunächst eine Mischung von Adrenalin mit seinem Kombinationspartner her, in der Adrenalin in 1/4000 molarer Lösung und die weitere Substanz in 1/1000 molarer Lösung enthalten war. Sie enthielt demnach jeden Partner in seiner Grenzkonzentration, wenn Adrenalin mit Allercur gemischt wurde; sie enthielt die sonstigen Aralkylamine aber in einer Verdünnung, die weit unterhalb der Konzentrationen lag, bei denen eine broncholytische Eigenwirkung möglich ist. Bei jeder der verschiedenen Arzneimittelmischungen wurde zunächst die antiasthmatische Wirkung der Ausgangslösung (1/4000 mol Adrenalin und 1/1000 mol Aralkylamin) geprüft. Eine Abschwächung der Adrenalinwirkung durch Kombinationspartner haben wir in keinem Fall beobachtet. Diese Lösung beider Stoffe wurde dann im Verhältnis 1 : 2 mit Wasser verdünnt und erneut geprüft. Wurde durch diese Verdünnung das Asthma immer noch bei 4 oder 5 Tieren einer Gruppe von 5 Tieren beseitigt, so wurden weitere Verdünnungen im Verhältnis 1 : 2 hergestellt, bis der Grenzwert überschritten war, d. h. bis 2 oder mehr Meerschweinchen nicht mehr asthmafrei wurden. Konnte die Ausgangsmischung ohne Verlust der antiasthmatischen Wirkung nur einmal verdünnt werden, so war die broncholytische Wirkung des Adrenalins durch die Beimischung der zweiten Substanz verdoppelt worden. Konnte sie zweimal verdünnt werden, so ergab sich eine Wirkungssteigerung auf das Vierfache. Über den Fehler der Methodik ist schon früher berichtet worden (FRIEBEL 1). Wir halten es für nicht wahrscheinlich, daß eine Abweichung um 2 Verdünnungsstufen durch den Fehler der Methodik bedingt sein kann. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Durch Änderung des Mischungsverhältnisses von Adrenalin und den übrigen Stoffen kann eine noch weitergehende Differenzierung der Substanzen vorgenommen werden, welche die Adrenalinwirkung 4fach steigern. Wir verdünnten die Ausgangsmischung, welche Adrenalin in M/4000 und den Kombinationspartner in M/1000 Lösung enthielt, zunächst nur einmal im Verhältnis 1 : 2 (Adrenalin M/8000 + Aralkylamin M/2000). Bei weiteren Verdünnungen wurde nur noch das Adrenalin verdünnt. Der Partner blieb im Gemisch immer in M/2000 Lösung ent-

Tabelle 2.

Der broncholytische Grenzwert von vernebelten Lösungen einiger Aralkylamine und die Steigerung der broncholytischen Wirkung des Adrenalins durch Kombination mit diesen Substanzen (allergisches Asthma).

Nr.	Handelsname	Broncholytischer Grenzwert der Einzelsubstanz	Wirkungssteigerung, d. Adrenalin durch d. Kombination erfährt
1	Pyribenzamin	M/100 unwirksam	4 >
2	Soventol	M/100 unwirksam	4 ×
3	Allercur	M/1000	4 >
4	Quart. Allercur	M/100 unwirksam	4 ×
5	Dabylen	M/100 unwirksam	4 ×
6	Thephorin	M/100 unwirksam	4 ×
7	Casantin	M/100 unwirksam	2 ×
8	Atosil	M/100 unwirksam	0
9	Megaphen	M/100 unwirksam	0
10	Pendiomid	M/100 unwirksam	0
11	Procaïn	M/100 unwirksam	2 ×
12	Oxyprocaïn	M/100 unwirksam	2 ×
13	Procaïnamid	M/100 unwirksam	0
14	Oxyprocaïnamid	M/100 unwirksam	0

halten. Arzneimittelmischungen dieser Reihe konnten zum Teil das Asthma noch beseitigen, wenn sie geringere Adrenalinkonzentrationen als M/16000 enthielten. Pyribenzamin z. B., das im erstgenannten Mischungsverhältnis 4fach steigernd wirkt, erlaubt in diesem Mischungsverhältnis eine Adrenalinverdünnung auf M/64000. Thephorin dagegen, das im erstgenannten Mischungsverhältnis ebenfalls 4fach steigernd wirkt, ermöglicht in der zweiten Reihe keine über M/16000 hinausgehende Verdünnung des Adrenalins.

Beim *Acetylcholinasthma* konnten wir durch ausschließliche Verabreichung von Adrenalin bei keiner Konzentration eine regelmäßig eintretende broncholytische Wirkung feststellen. Am häufigsten, aber nicht in jedem Falle beseitigte M/8000 Adrenalin das Acetylcholinasthma. Wir fanden bei 5 Versuchen 4 Therapieerfolge und 1 Versager. Pyribenzamin war beim Acetylcholinasthma in allen geprüften Konzentrationen, selbst in M/100 Lösung, wirkungslos. Eine Mischung von Adrenalin und Pyribenzamin im Verhältnis M/32000 Adrenalin : M/500 Pyribenzamin hatte aber eine eindeutige und zuverlässige antiasthmatische Wirkung. Beim *Histaminasthma* fanden wir bereits früher (unveröffentlicht), daß eine Mischung, die M/1000 Butyl-nor-adrenalin und M/2000 Allercur enthält, 16fach stärker als die Einzelsubstanzen wirkt. Das Prinzip der Steigerung

der broncholytischen Wirkung kann man demnach nicht nur beim tierexperimentellen allergischen Asthma, sondern auch beim Acetylcholin- und Histaminasthma nachweisen.

Besprechung der Ergebnisse.

a) *Pharmakologische Wirkungen von Arzneimittelmischungen, die Adrenalin und Antihistaminkörper oder verwandte Stoffe enthalten.* Eine Verstärkung einzelner Adrenalinwirkungen durch Antihistaminkörper, Lokalanästhetika und Ganglioplegia ist mehrfach beschrieben worden. MANCKE u. ORZECOWSKI, ROHKRÄMER, SADOVE u. Mitarb. nehmen einen Synergismus zwischen Procain und Adrenalin an. BOVET u. BOVET-NITTI und außerdem HAAS geben in tabellarischen Zusammenstellungen für eine Reihe von Antihistaminkörpern verstärkende Wirkungen auf den Adrenalin-effekt an. BEIN u. MEIER haben bei Versuchen mit Pendiomid eine Wirkungsverstärkung der peripher angreifenden Sympathicomimetica Adrenalin und Nor-adrenalin festgestellt. Über ähnliche Beobachtungen mit Tetraäthylammonium berichten ROSA u. GRASSI und MOE. Diese Angaben beziehen sich im wesentlichen auf Beobachtungen am Blutdruckversuch.

Bei einigen Antihistaminkörpern, z. B. beim Antergan, Neoantergan, Phenergan, Benadryl ist aber nicht nur eine Verstärkung, sondern auch eine Abschwächung des Adrenalineffektes auf den Blutdruck beobachtet worden (ref. nach HAAS). Dem Procain schreiben FROMMEL u. Mitarb. und außerdem HAZARD auch sympathicolytische Wirkungen zu. MIYAKA und außerdem MÖLLER geben an, daß Procain keinen Einfluß auf die adrenalinbedingte Blutdrucksteigerung hat.

Nicht alle Adrenalinwirkungen werden durch die gleichzeitige Anwendung von Antihistaminkörpern in gleicher Weise beeinflusst. Einige Antihistaminkörper, die den Adrenalineffekt auf den Blutdruck verstärken, schwächen die Adrenalinwirkung auf den Uterus ab. Unterschiedliche Dosierungen können gegensätzliche Wirkungen hervorrufen.

Man wird unsere Beobachtungen über den broncholyseverstärkenden Effekt einiger Antihistaminkörper und Lokalanästhetika daher nicht ohne weiteres sonstigen gleichsinnigen Beobachtungen an anderen Arbeitsmodellen zuordnen können.

b) *Einfluß der Kombinierung auf den Adrenalinabbau bzw. auf die Adrenalin-Inaktivierung.* Wenn die Antihistaminkörper und Lokalanästhetika den Adrenalinabbau in vivo durch desaminierende oder oxydierende Fermente behindern würden, wenn sie der Adrenalin-Inaktivierung durch Bildung von Schwefelsäure- oder Gluconsäurepaarlingen entgegenwirken würden, müßten unsere im Asthma-versuch erhaltenen Ergebnisse mit den im Blutdruckversuch gewonnenen Ergebnissen anderer Autoren im wesentlichen übereinstimmen. Hierfür ergab sich weder aus dem Studium der Literatur noch aus eigenen orientierenden Versuchen ein Anhalt. Eine Aminooxydasehemmung durch Antihistaminkörper wurde zwar von TICKNER nachgewiesen; er fand sie aber nicht nur bei Benadryl, Pyribenzamin und Thephorin, sondern vor allem auch beim Atosil (= Phenergan, = Promethazine). Bei unseren Versuchen aber steigerte Atosil die broncholytische Wirkung des Adrenalins nicht. Wir glauben daher, daß man die von ihm beschriebene Aminooxydasehemmung nicht zur Erklärung der Steigerung des antiasthmatischen Adrenalineffektes heranziehen kann.

c) *Pharmakologische Eigenwirkungen der wirkungssteigernden Stoffe.* Mit der Ausnahme von Allercur haben die untersuchten Stoffe in den von uns gebrauchten Konzentrationen keine eigene broncholytische Wirkung. Eine additive Wirkungsverstärkung können sie daher nicht ausüben. Auch die spezifische Hauptwirkung

der meisten Stoffe, die Antihistaminwirkung oder die lokalanästhesierende Wirkung, kann für die Wirkungssteigerung nicht verantwortlich sein, denn Thephorin, Soventol und Atosil, deren Antihistaminwirkung nahezu übereinstimmt, verhalten sich in der Kombination mit Adrenalin sehr unterschiedlich, und Casantin, das eine wesentlich geringere Antihistaminwirkung als Atosil hat, ist als Kombinationspartner für Adrenalin dem Atosil überlegen. Die speziellen pharmakologischen Eigenschaften der wirkungssteigernden Substanzen geben keine Erklärung für die Verbesserung der broncholytischen Wirkung des Adrenalins.

Eine befriedigende Erklärung für die Steigerung der broncholytischen Wirkung des Adrenalins durch einige Aralkylamine kann daher bis jetzt nicht gegeben werden. Am häufigsten und am stärksten ausgeprägt haben wir sie bei der Mischung von Antihistaminkörpern mit Adrenalin gefunden. Will man diesen Effekt für therapeutische Zwecke nutzbar machen, so wird man die Kombinationspartner von Fall zu Fall auf ihre Eignung hin prüfen müssen. Das günstigste Mischungsverhältnis muß gleichfalls experimentell ermittelt werden.

Zusammenfassung.

Die broncholytische Wirkung von Adrenalin kann durch gleichzeitiges Verabreichen einiger Antihistaminkörper und Lokalanästhetica erheblich gesteigert werden. Unter den geprüften 14 Substanzen zeigten Pyribenzamin, Soventol, Allercur, Dabylen, Thephorin, Casantin, Procain und Oxyprocain diesen Effekt. Atosil, Megaphen, Procainamid, Oxyprocainamid und Pendiomid waren unwirksam.

Literatur.

- BEIN, H. J., u. R. MEIER: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 446. — BOVET, D., u. F. BOVET NITTI: *Médicaments du Système Nerveux végétatif*, Basel: Karger 1948. — FRIEBEL, H.: (1) Histamin und anaphylaktischer Schock. Stuttgart: Schattauer 1953. — (2) Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 13 (1953); (3) **217**, 35 (1953). — FROMMEL, E., u. J. PIQUET: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 455. — HAAS, H.: Histamin und Antihistamine I und II. Aulendorf, Cantor, 1951/52. — HAZARD, M.: *Actualité Pharmacologique* **1**, 87 (1949). — MANCKE, R., u. G. ORZECOWSKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **205**, 311 (1948). — MIYAKE, T.: Jap. J. Pharmacol. **1**, 91 (1952). — MOE, G. K.: J. Amer. Med. Assoc. **137**, 1115 (1948). — MÖLLER, K. O.: Arch. internat. Pharmacodynamie **57**, 51 (1937). — ROHKRÄMER, H.: Z. inn. Med. **1948**, 532. — ROSA, L., u. C. GRASSI: Atti Soc. lombarda Sci. med. e. biol. **5**, 34 (1949/50). — SADOVE, M. S., G. M. WYANT, L. A. GITTELSON u. H. E. KRETSCHMER: J. Amer. Med. Assoc. **148**, 17 (1952). — TICKNER, A.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 606 (1951).

Dr. HANS FRIEBEL, Pharmakologisches Institut der Universität Bonn.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung
und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Prof. Dr. F. HILDEBRANDT).

Ist die auf nervalen Wege ausgelöste Gefäßdilatation nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol die Folge einer Hemmung des Sympathicotonus?

Von
J. DÖRNER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Oktober 1953.)

Zwei Gefäßgebiete sind es, die nach den Angaben des Schrifttums (siehe DÖRNER 1, 2, 3) und unseren eigenen Befunden nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol mit einiger Regelmäßigkeit mit einer ausgeprägten primären Durchblutungszunahme zu reagieren vermögen: die Skelettmuskel- und die Coronargefäße. Die gleichzeitige Beobachtung des Blutdrucks läßt keinen Zweifel, daß dieser Mehrdurchblutung nur eine aktive Gefäßdilatation zugrunde liegen kann. Diese Gefäßdilatation ist auf verschiedenste Weise erklärt worden (siehe DÖRNER 2).

Unsere eigenen Beobachtungen (vgl. auch folgende Arbeit) sowie gleichsinnige Befunde anderer Autoren (BINET und BURSTEIN; GAYET, GAYET und GUILLAUMIE; HARTMANN und FRASER; HOCHREIN und KELLER; TOURNADE; GRUZHIT und MOE) lassen keinen anderen Schluß zu als den, daß die erwähnte Erweiterung der Muskelgefäße, auf die wir uns wegen der übersichtlicheren experimentellen Bedingungen beschränken wollen, auf nervösem Wege ausgelöst wird. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ergibt sich folgende Alternativfrage: handelt es sich bei dieser neuralen Adrenalin- und Arterenolwirkung (SCHAEFER) um eine zentral, ganglionär oder reflektorisch bedingte Hemmung des Sympathicotonus, oder kommt die Gefäßdilatation unter Mitwirkung spezifisch vasodilatatorisch wirkender Nervenfasern zustande? Daß solche Vasodilatoren existieren bzw. daß ihnen eine Bedeutung zukommt, wird nicht allgemein anerkannt; die nerval bedingten Gefäßreaktionen werden dann ausschließlich durch Veränderungen im Tonus des sympathischen Nervensystems erklärt. Jeder Versuch, die primäre Dilatation der Skelettmuskelgefäße nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol auf eine solche Hemmung des sympathischen Vasokonstriktorentonus zurückführen zu wollen, kann aber an den oft bestätigten Befunden nicht vorbeigehen, daß die Adrenalin- und

Arterenoldilatation nur in den beiden anfangs erwähnten Gefäßgebieten in typischer Weise auftritt. Eine Hemmung des Sympathicotonus dagegen, sei sie zentraler, ganglionärer oder reflektorischer Natur, müßte zu einer universellen Gefäßerweiterung führen und besonders die Gefäßgebiete einschließen, die dem stärksten Konstriktorentonus unterliegen: Haut- und Splanchnicusgefäße. Gerade hier wird aber eine primäre Dilatation nicht gesehen. Eine in Erwägung zu ziehende verschiedene Reaktionsbereitschaft der einzelnen Gefäßgebiete ist nach unseren vergleichenden Untersuchungen (DÖRNER I) für diese Unterschiede nicht verantwortlich zu machen.

Im folgenden werden Befunde mitgeteilt, die ebenfalls gegen eine zentrale, ganglionäre oder reflektorische Senkung des Vasokonstriktorentonus als Ursache der Gefäßdilataion sprechen.

Methodik.

Die Ergebnisse wurden an 53 Hunden in Polamivet-Pernocton-Narkose gewonnen ($0,3 \text{ cm}^3/\text{kg}$ Polamivet¹ i. m., $\frac{1}{2}$ Std später $0,5 \text{ cm}^3/\text{kg}$ Pernocton² i. m.). Atmung der Tiere meist spontan durch Trachealkanüle. In jedem Versuch wurde die Durchblutung der Hinterextremitäten ein- oder beidseitig an der V. femoralis, mitunter auch zuzüglich oder allein an der A. femoralis gemessen. Zur Erfassung nur der Muskeldurchblutung wurde bei einem Teil der Hunde die Hinterextremität entweder enthäutet oder es wurden die Hautäste an der A. und V. femoralis unterbunden und der Fuß oberhalb der Ferse fest umschnürt. Teilweise gleichzeitige Registrierung der Durchblutung in der A. carotis communis.

Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach REIN unter Verwendung von mindestens 4—5 mal in einer Stromrichtung geeichten Elementen. An Arterien Verwendung des Elementtypes A, an Venen der Elementtypen A oder N. Auswertung der Kurven unter Berechnung der Relativänderungen der Durchblutung. In den Fällen, in denen auf Grund der Elementeigenschaften eine derartige quantitative Analyse nicht möglich war, wurde nur die Ausschlagsrichtung bewertet.

Blutdruckmessung in der A. brachialis mit dem photoelektrischen Transmissionsmanometer nach REIN. Alle Versuche wurden bei normalen Blutdruckverhältnissen durchgeführt. Injektion von l-Adrenalin und l-Arterenol ($0,01$ bis $1,0 \text{ } \mu\text{g}$) intravenös und in verschiedene arterielle Kreislaufabschnitte. Injektionsgeschwindigkeit $\frac{1}{2}$ min.

Ergebnisse.

1. Die typische Veränderung der Hinterextremitätendurchblutung nach intravenöser Injektion von Adrenalin oder Arterenol besteht bei Messung an der intakten Extremität (Muskulatur + Haut) entweder in einer primären Durchblutungszunahme als Ausdruck der Mehrdurchblutung der Muskulatur oder in einer primären Durchblutungsabnahme (DÖRNER I). Im letzteren Falle bedeutet das Fehlen einer Durch-

¹ Polamivet: enthält in 1 cm^3 5 mg 2-Dimethylamino-4,4'-diphenyl-heptanon (5)-hydrochlorid und $0,25 \text{ mg}$ Diphenylpiperidinoäthylacetamid-hydrochlorid.

² Pernocton: 10% ige wäßrige Lösung des Natriumsalzes der β -bromallyl-sek. butyl-barbitursäure.

blutungssteigerung meist nicht, daß eine solche in der Skelettmuskulatur nicht vorhanden ist, sondern lediglich, daß sie im Verhältnis zur Durchblutungsabnahme in den Hautgefäßen gering ist, so daß sie in der gemeinsamen Durchblutungskurve nicht in typischer Weise zum Ausdruck kommt. Bei Messung nur der Skeletmuskeldurchblutung kommt es fast immer zu primärer Mehrdurchblutung (Tab. 3). Die primäre Zunahme geht an der intakten Extremität fast immer in eine sekundäre Abnahme über, bei Registrierung der Muskeldurchblutung dagegen nur in einem Teil der Fälle (Tab. 3).

In Tab. 1 sind Beginn, Ende und Dauer dieser einzelnen Durchblutungsphasen an der intakten Extremität nach intravenöser Injektion

Tabelle 1.

	Beginn der			Ende der		Dauer der	
	prim. Zunahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme
<i>Adrenalin</i>							
0,01 γ /kg . . .	—	27,2 (9)	—	73,9 (9)	—	46,7 (9)	—
0,1 γ /kg. . . .	21,7 (9)	28,4 (22)	39,2 (7)	109,8 (22)	125,7 (7)	81,4 (22)	86,5 (7)
0,5 γ /kg. . . .	23,2 (18)	26,5 (18)	60,9 (11)	122,0 (18)	152,0 (11)	95,5 (18)	91,1 (11)
1,0 γ /kg. . . .	22,2 (20)	24,6 (21)	58,2 (18)	178,8 (21)	190,3 (18)	154,2 (21)	132,1 (18)
<i>Arterenol</i>							
0,01 γ /kg . . .	—	29,4 (9)	—	113,9 (9)	—	84,5 (9)	—
0,1 γ /kg. . . .	21,1 (16)	30,7 (14)	49,7 (15)	112,8 (14)	132,3 (15)	82,1 (14)	82,6 (15)
0,5 γ /kg. . . .	21,4 (22)	28,1 (17)	75,1 (22)	109,4 (16)	179,5 (22)	81,3 (16)	104,4 (22)
1,0 γ /kg. . . .	22,2 (24)	26,6 (22)	64,3 (22)	154,5 (22)	187,7 (22)	127,9 (22)	123,4 (22)

Beginn, Ende und Dauer der einzelnen Durchblutungsphasen der intakten Hinterextremität nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol. Die Dauer der primären Zunahme ergibt sich aus der Differenz der Zeitwerte von Spalte 2 und 4. Zeit in Sekunden nach Injektionsbeginn bzw. Dauer der Durchblutungsphasen in Sekunden.

Durchschnittswerte aus 35 Versuchen. Die eingeklammerten Zahlen geben die Anzahl der Reaktionen an. Da bei den einzelnen Versuchen teilweise mehrere Injektionen von der gleichen Dosierung vorgenommen und ausgewertet wurden, kann die Anzahl der Reaktionen größer als die Anzahl der Versuche sein (gilt auch für die folgende Tabelle).

von Adrenalin und Arterenol angegeben. Ein Vergleich der Dauer der primären Abnahme mit der Dauer der sekundären Abnahme, die also erst nach vorausgehender Durchblutungszunahme einsetzt, zeigt, daß die sekundäre Abnahme meist ebenso lang anhält wie die primäre Abnahme, obwohl diese sekundäre Durchblutungseinschränkung um die Dauer der primären Mehrdurchblutung verspätet einsetzt (im Durchschnitt um 36 sec). Dies ist deutlich bei der kleineren und mittleren Dosierung zu beobachten, während bei der Dosis von 1,0 γ /kg die Dauer der sekundären Minderdurchblutung kürzer wird als die der primären Durchblutungsabnahme. Letzteres Verhalten kommt in der Tab. 1 besonders beim Adrenalin zum Ausdruck, beim Arterenol ist es höchstens angedeutet vorhanden.

Will man diesen Befund bei Registrierung nur der *Muskeldurchblutung* der Hinterextremität prüfen, so begegnet man hier der Schwierigkeit, daß unter diesen Bedingungen, wie schon erwähnt, eine primäre Durchblutungsabnahme bei intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol selten ist. Wir haben daher, um zu brauchbaren Ergebnissen zu

Tabelle 2.

	Beginn der			Ende der		Dauer der	
	prim. Zunahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme	prim. Abnahme	sek. Abnahme
<i>Adrenalin</i>							
0,1 γ /kg .	22,5 (12)	28,3 (6)	65,0 (3)	115,8 (6)	176,7 (3)	87,5 (6)	111,7 (3)
0,5 γ /kg .	21,7 (15)	34,5 (4)	67,9 (13)	147,5 (4)	177,3 (13)	113,0 (4)	109,4 (13)
1,0 γ /kg .	22,0 (33)	22,8 (4)	71,3 (18)	205,0 (4)	220,8 (18)	182,2 (4)	149,5 (18)
<i>Arterenol</i>							
0,1 γ /kg .	19,8 (16)	32,5 (2)	55,0 (6)	110,0 (2)	125,0 (6)	77,5 (2)	70,0 (6)
0,5 γ /kg .	25,9 (72)	34,3 (12)	77,1 (63)	177,5 (12)	182,9 (63)	143,2 (12)	105,8 (63)
1,0 γ /kg .	23,3 (44)	29,9 (12)	66,9 (32)	199,1 (12)	211,4 (32)	169,2 (12)	144,5 (32)

Beginn, Ende und Dauer der einzelnen Durchblutungsphasen der Skelettmuskulatur der Hinterextremität nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol. Die Dauer der primären Zunahme ergibt sich aus der Differenz der Zeitwerte von Spalte 2 und 4. Zeit in Sekunden nach Injektionsbeginn bzw. Dauer der Durchblutungsphasen in Sekunden.

Durchschnittswerte aus 46 Versuchen. Die eingeklammerten Zahlen geben die Anzahl der Reaktionen an (siehe Legende zu Tab. 1).

gelangen, die Wirkungen intravenöser Adrenalin- und Arterenolinjektionen auf die Skeletmuskeldurchblutung aus einer anderen, zusammen mit KUSCHKE unternommenen Versuchsserie von 24 Hunden mitverwand, so daß wir insgesamt über 46 derartige Versuche verfügen, deren Resultate in Tab. 2 wiedergegeben sind. Wenn hier die Anzahl der einzelnen Reaktionen in einigen Fällen auch relativ klein ist, so ergibt sich aus Tab. 2 bei Messung ausschließlich der Muskeldurchblutung doch prinzipiell das gleiche Bild wie oben an Hand der Tab. 1 beschrieben: bei den kleineren und mittleren Dosierungen dauert die sekundäre Abnahme ebenso lang wie die primäre Durchblutungseinschränkung, bei der Dosis von $1,0 \gamma/\text{kg}$ ist die sekundäre Vasokonstriktion dagegen von kürzerer Dauer als die primäre Vasokonstriktion.

Dieses Ergebnis kommt sehr deutlich in den Adrenalinversuchen zum Ausdruck; beim Arterenol ist es deshalb nicht so klar, weil hier der Wert für die primäre Durchblutungsabnahme bei der Dosis von $0,5 \gamma/\text{kg}$ ein abweichendes Verhalten zeigt und dadurch das Resultat verzerrt. Auf Grund der Vergleiche der Arterenolwerte mit den Adrenalinwerten der Tab. 2 und den Adrenalin- und Arterenolwerten der Tab. 1 dürfen wir mit größter Wahrscheinlichkeit sagen, daß dieser Wert von 143,2 sec zufallsbedingt ist und die Dauer der primären Abnahme ebenfalls in der Größenordnung der Dauer der sekundären Abnahme angenommen werden muß. Wenn man bedenkt, daß Dauer und Ausmaß der einzelnen Durchblutungsphasen von Tier zu Tier größten Schwankungen unterliegen, so ist das Herausfallen eines einzigen Wertes nicht nur verständlich, sondern mehr noch ist überraschend, daß in beiden Tabellen dieselbe Grundtendenz in fast übereinstimmender Weise zum Ausdruck kommt: ebenso lange Dauer der sekundären wie der primären Vasokonstriktion bei der kleineren und mittleren von uns gewählten Dosierung, relative Verkürzung der sekundären Vasokonstriktion bei den höheren Dosen. Ein Vergleich der Stärke der primären und sekundären Minderdurchblutung läßt ähnliche Beziehungen erkennen.

Diese Befunde sind unseres Erachtens nur so zu verstehen, daß während der Dauer der primären Durchblutungszunahme Adrenalin und Arterenol entweder an der Gefäßmuskulatur konstriktorisch nicht wirksam werden können oder an ihrem Abbau verhindert werden oder beides zusammen, wobei ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Möglichkeiten nicht ausgeschlossen erscheint. Erst wenn die Konzentration ein gewisses Optimum übersteigt, das in unseren Versuchen bei etwa $0,5 \gamma/\text{kg}$ angenommen werden muß, dann können beide Substanzen teilweise eine konstriktorische Wirkung während der primären Durchblutungszunahme entfalten.

Dies ist nicht nur aus obigen Ergebnissen zu folgern, sondern kommt auch darin zum Ausdruck, daß bei Steigerung der Dosis von $0,1 \gamma/\text{kg}$ auf $0,5 \gamma/\text{kg}$ die primäre Mehrdurchblutung wesentlich stärker wird (Tab. 3) und länger anhält (zu ersehen aus dem späteren Beginn der sekundären Abnahme in der 4. Spalte der Tab. 1 und 2), während bei Erhöhung der Dosis auf $1,0 \gamma/\text{kg}$ das Ausmaß der primären Zunahme nur noch gering zunimmt (Tab. 3). Gleichzeitig erfährt auch die Dauer der primären Mehrdurchblutung keine weitere Zunahme mehr, sondern nimmt eher wieder etwas ab (4. Spalte der Tab. 1 und 2). Damit stehen diese Befunde in Einklang mit der relativen Verkürzung der sekundären Abnahme bei der Dosis von $1,0 \gamma/\text{kg}$, da nun

ein Teil des Adrenalins und Arterenols auf Grund der stärkeren Konzentration schon während der primären Dilatation konstriktorisch wirksam und verbraucht wird und somit die Dilatation antagonistisch beeinflußt. Die Folge ist, daß 1. die lokal-konstriktorische Wirkung nicht mehr so lange anhalten kann und 2. Dauer und Ausmaß der primären Durchblutungszunahme relativ oder absolut vermindert werden.

In Abb. 1 sind die Ergebnisse schematisch skizziert. Selbstverständlich gelten die aufgezeigten Beziehungen zwischen Dosis und Wirkung nur

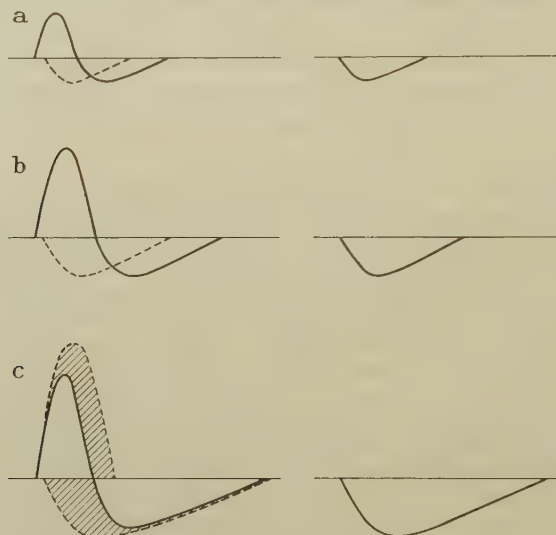


Abb. 1. Schematische Darstellung der Dauer und des Ausmaßes der einzelnen Durchblutungsphasen der Hinterextremitätenmuskulatur nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol. Links primäre Durchblutungszunahme mit sekundärer Durchblutungsabnahme, rechts primäre Durchblutungsabnahme. Die ausgezogenen Kurven geben den registrierten Durchblutungsablauf wieder; die nach unten gezeichneten unterbrochenen Kurven stimmen mit den rechtsseitigen primären Durchblutungsabnahmen überein und deuten den Reaktionsverlauf an, wenn keine primäre Mehrdurchblutung vorhanden ist. Die Proportionen entsprechen den Durchschnittswerten der Tab. 2. — *a* 0,1 γ /kg. Die sekundäre Durchblutungsabnahme dauert so lange wie die primäre Minderdurchblutung und ist um die Dauer der primären Zunahme zeitlich verschoben. Während der primären Zunahme können Adrenalin und Arterenol konstriktorisch nicht wirksam werden. — *b* 0,5 γ /kg. Die primäre Zunahme nimmt gegenüber der Dosis von 0,1 γ /kg an Intensität und Dauer zu. Sonst wie bei *a*. — *c* 1,0 γ /kg. Die primäre Mehrdurchblutung nimmt nur noch geringgradig zu, während ihre Dauer wieder etwas abnimmt. Die sekundäre Minderdurchblutung hält nicht mehr so lange an wie die primäre Abnahme. Ein Teil des Adrenalins und Arterenols (entsprechend der nach unten gezeichneten schraffierten Fläche) wird nun auf Grund der höheren Konzentration schon während der primären Mehrdurchblutung konstriktorisch wirksam und beeinflußt antagonistisch die primäre Mehrdurchblutung, die dadurch um annähernd den Betrag der nach oben gezeichneten schraffierten Fläche vermindert wird. — Weitere Erläuterungen siehe Text.

für die Beobachtungen an einem Tierkollektiv, d. h. bei Ermittlung von Durchschnittswerten. Sie besagen nicht, daß im einzelnen Fall das Dosis-Wirkungsverhältnis nicht nach der einen oder anderen Seite verschoben sein kann.

Obige Befunde lassen sich mit der Vorstellung einer Senkung des Vasokonstriktorentonus als Ursache der Dilatation der Muskelgefäße

nicht vereinbaren. Würde dieser Mechanismus, gleich wie er zustande käme, eine Rolle spielen, dann müßten während der Vasodilatation, die ja dann lediglich die Folge einer verminderten Adrenalin- oder Arterenolfreisetzung an den sympathischen Nervendigungen wäre, dieselben gleichzeitig auf dem Blutwege zugeführten Überträgerstoffe nicht nur wirksam werden, sondern auch gleichzeitig als Ersatz für die verminderte Produktion von Adrenalin oder Arterenol einspringen und verbraucht werden. Es könnte nicht zum Entstehen einer Dilatation kommen, zumindest aber müßte die sekundäre konstriktorische Phase gegenüber der primären Konstriktion wesentlich verkürzt sein.

2. Intravenöse und lokale intraarterielle Injektionen von Adrenalin und Arterenol führen in der A. carotis communis fast regelmäßig zu einer Durchblutungsabnahme (DÖRNER 1). Injizierten wir dagegen beide Substanzen mittels eines Herzkatheters in die Aorta thoracica desc. oder den obersten Abschnitt der Aorta abd., so kam es in der A. carotis communis zu einer Mehrdurchblutung, die in einem Teil der Fälle nicht mehr als 10—15% betrug und die wir als druckpassiv bewertet haben, obwohl die Durchblutung der A. carotis communis von den in unseren Versuchen auftretenden Blutdruckänderungen oft nicht beeinflußt wird. Daneben registrierten wir aber auch Durchblutungszunahmen bis zu 50—60%, die weder als druckpassiv anzusprechen waren noch sonst eine Beziehung zum Blutdruckverhalten erkennen ließen. Diese Mehrdurchblutungen in der A. carotis communis konnten einige Sekunden nach Injektionsbeginn einsetzen, d. h. zu derselben Zeit wie in diesen Fällen die Durchblutungszunahme in der Muskulatur der Hinterextremität, und zeigten in ihrem Kurvenverlauf mitunter weitgehende Übereinstimmung mit der Durchblutungskurve der V. femoralis.

In Abb. 2a ist ein Beispiel für eine solche gleichverlaufende Durchblutungszunahme in der A. carotis communis und der V. femoralis nach Injektion von 0,8 γ /kg Arterenol in die Aorta thoracica in Höhe der 12. Rippe wiedergegeben. Bei Injektion in den unteren Teil der Aorta abd. bleibt die Durchblutung der A. carotis communis unbeeinflußt, während in der V. femoralis eine primäre Durchblutungsabnahme erfolgt (Abb. 2b).

Diese Zunahme der Durchblutung in der A. carotis communis ist auf eine Dilatation der die Kopfmuskulatur versorgenden Gefäße zurückzuführen. Sie tritt bei intravenöser Injektion als echte Mehrdurchblutung nicht in Erscheinung, da im Kopfgebiet des Hundes die Haut im Verhältnis zur Muskulatur stark überwiegt, so daß die lokal-konstriktorische Wirkung im Hautgefäßgebiet den schwächeren auf nervösem Wege hervorgerufenen dilatatorischen Effekt an den Muskelgefäßen in der Durchblutungskurve der A. carotis communis nicht in Erscheinung treten läßt. Dagegen kommt des öfteren auch bei intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol diese besondere Reaktionsweise der Gefäße

der Kopfmuskulatur in der Durchblutungskurve der A. carotis communis in der Weise zum Ausdruck, daß die Durchblutungsabnahme in letzterer vorübergehend vermindert wird, ohne daß die Ausgangsdurchblutung erreicht oder überschritten wird. Bei lokaler intraarterieller Injektion fehlt diese Reaktion. Erst bei einer Injektionsart, bei der die lokalen Gefäßwirkungen beider Substanzen entfallen, tritt die nerval-dilatatorische Komponente deutlich in Erscheinung. Ebenso konnte durch

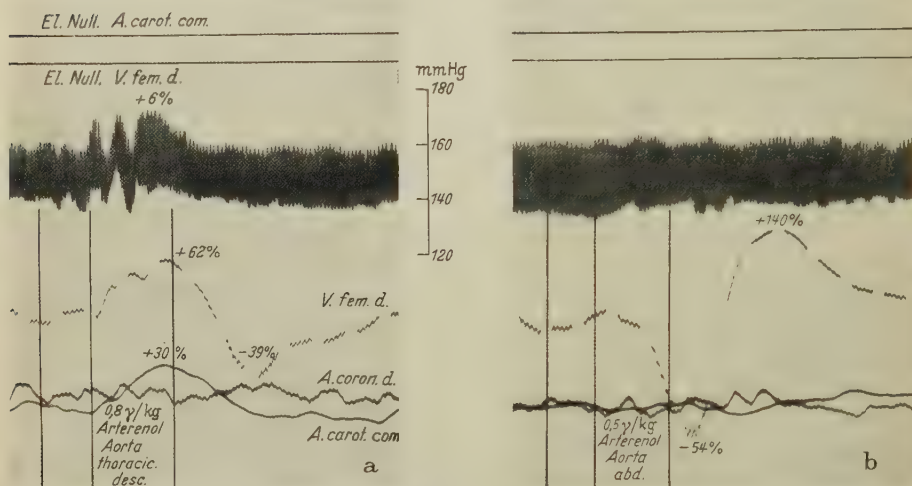


Abb. 2. Hund 14,0 kg. Blutdruck- und Durchblutungsänderungen der A. carotis com. und V. fem. d. (nur Muskeldurchblutung) nach Injektion mittels Herzkatheter von 0,8 g/kg Arterenol in die Aorta thoracica in Höhe der 12. Rippe (a) und 0,5 g/kg Arterenol in die Aorta abd. 1 cm oberhalb der Teilung (b). Die oberen Linien bedeuten die Elementnulllinien. Zwischen 1. und 2. Lichtsignal Injektion des Arterenols in den Katheter, zwischen 2. und 3. Lichtsignal Injektion in die Aorta. Zeitschreibung 20 sec. Bei Injektion in die Aorta thoracica sofort einsetzende gleich verlaufende Durchblutungszunahme in A. carotis com. und V. fem. d. Die A. coron. d. zeigt trotz Blutdruckanstieges keine Mehrdurchblutung. Bei anschließender Injektion in die Aorta abd. bleibt die Durchblutung der A. carotis com. unverändert, während die V. fem. d. mit starker primärer Abnahme reagiert (b). A. carotis com.: Elem. Typ A, $x = 0,43$; V. fem. d.: Elem. Typ N, $x = 0,35$.

vorherige Injektion von Hydergin in die A. carotis communis die dilatatorische Wirkungskomponente intravenöser Injektionen von Adrenalin und Arterenol aufgezeigt werden.

Dieser Befund, der zeigt, daß die Durchblutung eines Teiles des Versorgungsgebietes der A. carotis communis von einer Stelle beeinflusst werden kann, die offenbar in oder in der Nähe der oberen Bauchaorta liegt, schließt eine ganglionäre Hemmung des Sympathicotonus als Ursache der Gefäßdilatation aus und ist auf Grund unserer heutigen Kenntnisse über Aufbau und Funktion des vegetativen Nervensystems auch mit einer reflektorischen Senkung des Sympathicotonus nur schwer zu erklären. Demgegenüber werden nach Ergebnissen von ERICI, FOLKOW

und UYNÄS die Gefäße der Zunge und wahrscheinlich auch der angrenzenden von der A. lingualis durchbluteten Gebiete von vasodilatatorischen Nervenfasern versorgt.

3. Eine Analyse der Möglichkeiten, wie es eventuell zu einer Hemmung des Sympathicotonus nach Injektion von Adrenalin und Arterenol kommt, ergibt, daß alle bekannten Mechanismen, die zu einer reflektorischen oder zentralen Senkung des Vasokonstriktorentonus führen können, für die Adrenalin- und Arterenoldilatation der Muskelgefäße nicht verantwortlich zu machen sind: Blutdruckanstieg, Empfindlichkeitssteigerung der Pressoreceptoren, Reizung der Chemoreceptoren des Carotissinus oder dort vermuteter spezifischer adrenalin- und arterenol-empfindlicher Chemoreceptoren, Reizung eventuell im Herzen gelegener Receptoren nach Art des BEZOLD-JARISCH-Reflexes, Wirkung beider Substanzen auf Gefäße, Zentren oder Receptoren im Gehirn (BINET und BURSTEIN; DÖRNER; GAYET, GAYET und GUILLAUMIE; GRUHZIT und MOE; HARTMANN, KILBORN und FRASER; TOURNADE; WITZLEB). Es bleibt somit zu prüfen, ob der erstmalig von MARRAZZI erhobene und später bestätigte Befund (BÜLBRING und BURN; MARGUTH, RAULE und SCHAEFER), daß Adrenalin bei Einwirkung auf die sympathischen Ganglien die Erregungsübertragung in denselben hemmt und auf diese Weise ein Nachlassen des Sympathicotonus bewirkt, ursächlich für die zur Diskussion stehende Dilatation herangezogen werden kann (SCHAEFER). Nun hat aber Adrenalin nicht nur eine ganglienblockierende Wirkung, sondern es führt in kleineren Dosen, die nach SCHAEFER bei schneller Injektion bis 0,1 γ /kg oder etwas darüber reichen, nach BÜLBRING und BURN wesentlich höher liegen, zu einer Förderung der Erregungsübertragung in den sympathischen Ganglien. Arterenol wirkt ähnlich. Dies hat hinsichtlich unserer Fragestellung zweierlei zur Folge:

a) bei kleineren Dosen (0,1 γ /kg oder weniger und schneller Injektion) müßte die lokal-konstriktorische Wirkung beider Substanzen infolge deren fördernder Wirkung auf die Erregungsübertragung in den sympathischen Ganglien noch verstärkt werden, die Dilatation aber ausbleiben;

b) mit steigender Dosis müßte der Beginn der Dilatation früher einsetzen, da die zur Hemmung der Erregungsübertragung in den sympathischen Ganglien notwendige Konzentration bei Erhöhung der Dosis früher erreicht würde.

Unsere Ergebnisse zeigen in Tab. 3, daß auch bei den kleinsten von uns verwandten Dosierungen (0,01—0,1 γ /kg) und langsamer Injektion ($\frac{1}{2}$ min) die primäre Mehrdurchblutung der Muskulatur in einem hohen Prozentsatz auftritt (beim Adrenalin in 50%, beim Arterenol in 78% der auf die Injektion überhaupt reagierenden Fälle). Ein qualitativer Unterschied zwischen kleinen und höheren Dosen ist also nicht zu beobachten.

Ferner zeigen Tab. 1 und 2 in der zweiten Spalte, daß der Beginn der Dilatation im Durchschnitt zu derselben Zeit erfolgt unabhängig von der Dosierung. Insbesondere setzt bei höherer Dosis die Dilatation nicht früher ein.

Tabelle 3.

	unverändert	primäre Zunahme	sekundäre Abnahme	primäre Abnahme	primäre Abnahme mit überlagerter Zunahme
<i>Adrenalin</i>					
0,01—0,1 γ /kg . . .	25%	+ 23 37%	— 15 12%	— 20 25%	12%
0,5 γ /kg	5%	+ 64 75%	— 15 60%	15%	5%
1,0 γ /kg	4%	+ 81 96%	— 38 48%	—	—
<i>Arterenol</i>					
0,01—0,1 γ /kg . . .	17%	+ 43 65%	— 20 26%	— 23 17%	—
0,5 γ /kg	—	+ 75 93%	— 30 75%	7%	—
1,0 γ /kg	—	+ 82 93%	— 34 63%	7%	—

Durchblutungsänderung der Skelettmuskulatur der Hinterextremität nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol. Die Prozentzahlen bedeuten die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Durchblutungsphasen, die Zahlen über den Prozentzahlen die prozentuale Veränderung der Durchblutung, bezogen auf eine Ausgangsdurchblutung von 100% (z. B. + 23 und — 15 bedeuten eine Zunahme der Durchblutung um 23% und eine Abnahme derselben um 15%). Da es im Wesen der Durchströmungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach REIN liegt, daß meist nicht alle Reaktionen quantitativ ausgewertet werden können, konnte das Ausmaß der Durchblutungsänderungen nur teilweise angegeben werden.

Durchschnittswerte aus 22 Versuchen.

Wie eingangs erwähnt, mußte ein ganglienblockierender Effekt des Adrenalins und Arterenols sich universell am Gefäßsystem auswirken, wie auch die Gefäßwirkung der sogenannten Ganglienblocker nicht auf die Muskelgefäße beschränkt ist. Neuerdings wird von TUM SUDEN und MARRAZZI darauf hingewiesen, daß die Hemmwirkung des Adrenalins ein allgemeines Phänomen an cholinergischen Synapsen ist. Wir glauben, auf Grund obiger Befunde eine ganglionäre Wirkung des Adrenalins und Arterenols als Ursache der Dilatation der Muskelgefäße ausschließen zu können. Damit sollen keineswegs die Ergebnisse von MARRAZZI und der anderen Autoren in Zweifel gestellt werden; sie können unseres Erachtens

jedoch nur so verstanden werden, daß beide Substanzen von einem gewissen Dosierungsbereich an die ganglionäre Erregungsübertragung zwar hemmen, diese Hemmwirkung aber alle sympathisch versorgten Gefäßgebiete betrifft und bei intravenöser Injektion infolge der lokal-konstriktorischen Wirkung des Adrenalins und Arterenols überkompensiert wird, daher als solche nicht in Erscheinung tritt.

Besprechung der Ergebnisse.

Die obigen Ergebnisse führen unter Einbeziehung verschiedener Literaturbefunde übereinstimmend zu derselben Schlußfolgerung: es konnte experimentell kein Anhaltspunkt dafür gefunden werden, daß die auf nervösem Wege ausgelöste primäre Dilatation der Skeletmuskelgefäße nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol die Folge einer reflektorischen, zentralen oder ganglionären Hemmung des Sympathicotonus ist. Darüberhinaus fehlt bisher jede Vorstellung davon, wie ein Nachlassen des Vasokonstriktorentonus zu einer spezifischen Dilatation der Skeletmuskel- und Coronargefäße führen könnte, ohne in den anderen Gefäßgebieten, die teilweise einem stärkeren Sympathicotonus unterliegen (z. B. Haut- und Splanchnicusgefäße) nicht gleichzeitig auch eine Vasodilatation hervorzurufen. Gerade hier erfolgt aber nach Adrenalin- und Arterenolinjektion immer eine primäre Vasokonstriktion. Es darf daher auf die in spezifischer Weise Skeletmuskel- und Coronargefäße versorgenden im Grenzstrang des Sympathicus verlaufenden sogenannten Vasodilatoren und auf deren mögliche Bedeutung beim Zustandekommen der Adrenalin- und Arterenoldilatation hingewiesen werden.

Elektrische Reizung des Grenzstrangs bzw. der das Herz versorgenden sympathischen Fasern führt unter geeigneten Bedingungen zu Dilatation der Skeletmuskel- und Coronargefäße. Nach W. R. HESS bestätigt „eine Gegenüberstellung der Arterienreaktion auf Adrenalin einerseits, auf Sympathicusreiz andererseits innige Beziehungen zwischen den beiden Reizmechanismen“ und weiter „Die Adrenalinkonstriktion finden wir in den Gebieten am stärksten ausgeprägt, in welchen die sympathischen Vasokonstriktoren die größte Entfaltung aufweisen. Die Adrenalindilatation bevorzugt auch jene Kreislaufabschnitte, in welchen die sympathisch vermittelte Konstriktion zugunsten einer dilatierenden Sympathicuswirkung zurücktritt“.

Wir haben an anderer Stelle (DÖRNER 2, 3) per exclusionem wahrscheinlich machen können, daß die Dilatation der Coronar- und Skeletmuskelgefäße von in oder in der Nähe der Aorta asc. bzw. des oberen Abschnittes der Aorta abd. gelegenen adrenalin- und arterenolempfindlichen chemosensiblen Stellen oder Organen ausgeht. Die Annahme, daß die im Grenzstrang des Sympathicus verlaufenden Vasodilatoren als Weg der Erregungsleitung benutzt werden, ist bei der auffallenden Ähnlichkeit zwischen der Wirkung elektrischer Sympathicusreizung und den auf nervalem Wege vermittelten Adrenalin- und Arterenolwirkungen naheliegend. Die Wirkungsweise dieser Vasodilatoren ist unklar.

Die Ergebnisse der Tab. 1 und 2 berechtigen zu der Folgerung, daß die Gefäßdilatation nach Adrenalin und Arterenol durch eine bei Erregung

vasodilatatorischer Nervenfasern frei werdende Substanz erfolgt, die die Gefäßmuskulatur gegenüber der konstriktorischen Adrenalin- und Arterenolwirkung unempfindlich macht. Daß dabei zunächst an das Acetylcholin gedacht werden muß, ergibt sich aus der Tatsache, daß die bei elektrischer Reizung des Grenzstrangs in der Peripherie auftretende Vasokonstriktion durch lokale intraarterielle Acetylcholininfusion in eben überschwelliger Dosierung vollkommen aufgehoben werden kann (REIN) bzw. daß die bei Carotis-Sinuentlastung auftretende periphere Vasokonstriktion sich während einer lokalen Acetylcholininfusion in dem betreffenden Gefäßgebiet nicht durchzusetzen vermag (GROSSE-BROCKHOFF, SCHNEIDER und SCHOEDEL). Nach letzteren Autoren wird ebenfalls die konstriktorische Adrenalinwirkung während einer lokalen intraarteriellen Acetylcholininfusion nicht wirksam. In eigenen Versuchen konnten wir uns davon überzeugen, daß bei gleichzeitiger lokaler intraarterieller Injektion von Acetylcholin und Arterenol es zunächst zu einer Gefäßdilatation kommt und die Arterenolkonstriktion erst einsetzt, wenn die Acetylcholinwirkung abgeklungen ist.

Zusammenfassung.

Narkotisierte Hunde. Durchströmungsmessung verschiedener Gefäßgebiete mit der Diathermie-Thermostromuhr nach REIN. Intravenöse und intraaortale Injektionen von 0,01—1,0 γ /kg Adrenalin und Arterenol.

1. Bei intravenöser Injektion beider Substanzen dauert die sekundäre Vasokonstriktion der Hinterextremitätengefäße, die nach einer primären Dilatation auftritt, bei den Dosierungen bis 0,5 γ /kg ebenso lang oder länger als die Vasokonstriktion, die ohne primäre Dilatation einsetzt.

2. Injektion von Adrenalin und Arterenol in die Aorta thoracica desc. und den oberen Teil der Aorta abd. kann zu nicht druckpassiver Mehrdurchblutung der A. carotis communis führen; Injektion in den unteren Teil der Aorta abd. hat keine derartige Mehrdurchblutung der A. carotis communis zur Folge.

3. Die Dilatation der Skelettmuskelgefäße der Hinterextremität nach intravenöser Injektion tritt auch bei den Dosierungen auf, die in den sympathischen Ganglien nicht eine Hemmung, sondern eine Förderung der Erregungsübertragung bewirken. Ebenso setzt die Dilatation nach durchschnittlich derselben Zeit ein unabhängig von der Dosierung.

Unter Einbeziehung verschiedener Literaturbefunde konnte kein Anhaltspunkt gefunden werden, daß die auf nervösem Wege ausgelöste primäre Dilatation der Skelettmuskelgefäße nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol durch eine reflektorische, zentrale oder ganglionäre Hemmung des Sympathicotonus zustande kommt. Die Möglichkeit spezifischer vasodilatatorischer Nervenfasern beim Zustandekommen der Adrenalin- und Arterenoldilatation wird erörtert.

Literatur.

BINET, L., et M. BURSTEIN: Sur la vasodilatation périphérique d'origine adré-nalique. C. r. Soc. Biol. (Paris) **141**, 630 (1947). — BÜLBRING, E., and J. H. BURN: An action of adrenaline on transmission in sympathetic ganglia, which may play a part in shock. J. of Physiol. **101**, 289 (1942/43). — DÖRNER, J.: (1) Tierexperimen-telle Studien zur Frage der Kreislaufwirkungen des Adrenalins und Arterenols. Habil.-Schrift Gießen 1952. — (2) Zur Ursache der primären Mehrdurchblutung der Skelettmuskulatur nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. Pflügers Arch. **257**, 464 (1953). — (3) Zur Ursache der Mehrdurchblutung der Coronararterien nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. Pflügers Arch. **257**, 480 (1953). — (4) Zur Frage der Gefäßdilatation nach Adrenalin. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **221**, 286 (1954). — ERICI, I., B. FOLKOW and B. UVNÄS: Sympathetic vasodilator nerves to the tongue of the cat. Acta Physiol. Scand. **25**, 1 (1952). — GAYET, R., TH. GAYET et M. GUILLAUMIE: Actions vasomotrices de l'adrénaline sur les muscles. Processus périphérique vasoconstricteur et processus central vaso-dilatateur. C. r. Soc. Biol. (Paris) **97**, 1145 (1927). — GROSSE-BROCKHOFF, F., M. SCHNEIDER u. W. SCHOEDEL: Über vasomotorische Interferenzen im Muskelgefäßnetz bei künst-licher Hyperämie durch gefäßerweiternde Substanzen. Pflügers Arch. **237**, 178 (1936). — GRUHZIT, C. C., and G. K. MOE: Reflex vasodilatation induced by epi-nephrene. Amer. J. Physiol. **171**, 730 (1952). — HARTMANN, F. A., and L. FRASER: The mechanism for vasodilatation from adrenalin. Amer. J. Physiol. **44**, 353 (1917). — HARTMANN, F. A., L. G. KILBORN and L. FRASER: Location of the adrenalin vasodilator mechanisms. Amer. J. Physiol. **46**, 168 (1918). — HOCHREIN, M., u. J. KELLER: Über die Wirkung des Adrenalins und adrenalinverwandter Körper (Sympatol und Ephetonin) auf den Kreislauf. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **156**, 37 (1930). — MARGUTH, H., W. RAULE u. H. SCHAEFER: Aktionsströme in zentri-fugalen Herznerven. Pflügers Arch. **254**, 224 (1951). — MARRAZZI, A. S.: Inhibition at a sympathetic synapse. Amer. J. Physiol. **126**, P 579 (1939). — Adrenergie in-hibition at sympathetic synapses. Amer. J. Physiol. **127**, 738 (1939). — REIN, H.: Das Zusammenwirken von Acetylcholin, Mangelstoffwechselprodukten und vege-tativer Innervation als Grundlage der natürlichen Vasomotorik des Skelettmuskels. Pflügers Arch. **248**, 111 (1944). — SCHAEFER, H.: Grundprobleme der vegetativen tonischen Innervation. Acta Neurovegetativa **4**, 201 (1952). — Persönl. Mitteilung. — SUDEN, TUM, C., and A. S. MARRAZZI: Synaptic inhibitory action of adrenaline at parasympathetic synapses. Fed. Proc. **10**, 138 (1951). — TOURNADE, A.: Action vaso-dilatatrice centrale de l'adrénaline. Bull. Acad. r. Belg. Cl. Sci. V. s. **13**, 271 (1933). — TOURNADE, A., et J. MALMÉJAC: De l'action vaso-dilatatrice centrale de l'adrénaline C. r. Soc. Biol. (Paris) **113**, 163 (1933). — WITZLEB, E.: Über die Er-regung der Presso- und Chemoreceptoren in der Carotissinusregion durch 1-Adre-nalin und 1-Noradrenalin. Pflügers Arch. **257**, 244 (1953).

Doz. Dr. med. J. DÖRNER, Pharmakologisches Inst. der Med. Akademie Gießen,
z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung und
Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Professor Dr. F. HILDEBRANDT).

Zur Frage der Gefäßdilatation nach Adrenalin.

Von
J. DÖRNER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Oktober 1953.)

Während allgemein anerkannt wird, daß Adrenalin und nach neueren Ergebnissen auch Arterenol neben Gefäßkonstriktion in bestimmten Gefäßgebieten, besonders in Skelettmuskel- und Coronargefäßen auch ausgesprochene Dilatation bewirken können (Literatur siehe DÖRNER 1, 2), gehen die Meinungen hinsichtlich der Ursache der dilatatorischen Adrenalinwirkung sehr auseinander (DÖRNER 1).

Ohne auf die einzelnen diesbezüglichen Theorien, die an erwähnter Stelle kurz wiedergegeben sind, hier eingehen zu wollen, lassen sich zwei prinzipiell verschiedene Richtungen unterscheiden. Auf der einen Seite wird in der Gefäßdilatation die Folge einer direkten Adrenalinwirkung auf die Gefäßmuskulatur gesehen, da sie auch bei lokaler intraarterieller Injektion (CLARK; DALE und RICHARDS [1927]; GROSS; HARTMANN, KILBORN und FRASER; KLEINSORG und SCHMIER; MEIER und GROSS) oder bei intravenöser Injektion nach Denervierung der Extremität auftreten kann (ALLEN; BÜLBRING und BURN; BURN und HUTCHEON; DALE und RICHARDS; McDOWALL; DUFF und SWAN; GRUBER [1918]; HARTMANN, KILBORN und FRASER; IMIG, RANDALL und HINES). Andererseits wird die Gefäßerweiterung auf eine zentrale, reflektorische oder ganglionäre, jedenfalls nerval vermittelte Wirkung zurückgeführt, da sie einmal in der isolierten und künstlich von einem zweiten Tier durchströmten, mit dem Organismus nur nerval in Zusammenhang gelassenen Extremität bei Injektion des Adrenalins in den Rumpf des Tieres vorhanden sein kann (BINET und BURSTEIN; GAYET, GAYET und GUILLAUMIE; HARTMANN und FRASER; HOCHREIN und KELLER; TOURNADE), wobei das Blutdruckverhalten keine Rolle zu spielen braucht, zum anderen an der benervten Extremität auftreten kann, während an der denervierten keine Änderung oder eine Konstriktion erfolgt (McDOWALL; DUFF und SWAN; GRANDPIERRE und Mitarbeiter; GRUBER [1917]; HARTMANN und FRASER; HARTMANN, KILBORN und FRASER; PUCCINELLI; SWAN). Darüber hinaus wird am normalen Tier bei lokaler intraarterieller Injektion in die Extremitätengefäße im Gegensatz zur intravenösen Injektion häufig eine reine Durchblutungsabnahme erhalten (Literatur siehe DÖRNER¹).

Vergleichende Versuche mit intravenöser und lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol führten zu den im folgenden mitgeteilten Ergebnissen, die zeigen, daß die Gefäßdilatation nach Adrenalin hinsichtlich ihrer Ursache verschiedenartig beurteilt werden muß und daß man daher nicht gemeinhin von einer Adrenalindilatation sprechen kann, ohne die Art dieser Dilatation näher anzugeben.

Methodik.

Die Methodik ist an anderer Stelle (DÖRNER¹) ausführlich wiedergegeben (vgl. auch vorausgehende Arbeit S. 274). 1-Adrenalin und 1-Arterenol (0,01—1,0 γ /kg) wurden an 53 Hunden intravenös und lokal intraarteriell entweder in den unteren Abschnitt der Aorta abd. oder direkt in die A. fem. mittels seitenständig eingebundener Kanülen in $\frac{1}{2}$ min injiziert. Durchströmungsmessung an der V. fem.; teilweise waren die Hautäste an A. und V. fem. unterbunden oder die Extremität enthäutet.

Ergebnisse.

1. Nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol kommt es fast immer in der Skelettmuskulatur der Hinterextremität zu einer primären Mehrdurchblutung als Folge einer aktiven, nicht durch einen eventuellen Blutdruckanstieg reflektorisch ausgelösten Gefäßdilatation (DÖRNER 1). Diese Mehrdurchblutung ist nach Arterenol ebenso stark wie nach Adrenalin und in einem Teil der Fälle von sekundärer Durchblutungsabnahme gefolgt. Auch hinsichtlich der Dauer der Mehrdurchblutung besteht zwischen Adrenalin und Arterenol weitgehende Übereinstimmung. Die Durchblutungszunahme setzt im Durchschnitt 5 bis 7 sec früher ein als die in seltenen Fällen auftretende primäre Durchblutungsabnahme in der Skelettmuskulatur oder die häufiger vorhandene primäre Durchblutungseinschränkung bei Messung der Durchblutung des intakten Beines (Muskulatur + Haut) (siehe DÖRNER 3 Tab. 1 bis 3).

2. Bestehen somit bei intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol hinsichtlich der Beeinflussung der Skelettmuskeldurchblutung keine grundlegenden Unterschiede zwischen beiden Substanzen, so ändert sich dies, wenn die Injektionen intraarteriell in das zuführende Blutgefäß vorgenommen werden. In diesen Fällen kommt es nach Arterenol vollkommen unabhängig von der Dosierung immer zu einer primären Abnahme der Durchblutung in der Extremitätenmuskulatur. Es ist uns auch kein Fall aus der Literatur bekannt, in dem Arterenol bei dieser Injektionsart zu einer primären Durchblutungssteigerung geführt hätte. Beim Adrenalin erfolgt in einem Teil der Fälle ebenfalls eine primäre Durchblutungseinschränkung, obwohl in denselben Versuchen bei intravenöser Injektion und entsprechend höherer Dosierung es in der Peripherie meist zu einer aktiven Mehrdurchblutung kommt. Bei einem Teil der Versuchstiere führen die lokalen intraarteriellen Adrenalininjektionen dagegen zu einer primären Zunahme der Muskeldurchblutung, die in Übereinstimmung mit ROOME immer von sekundärer Abnahme gefolgt ist (Abb. 4 b). Eine Zusammenstellung unserer diesbezüglichen Ergebnisse findet sich in Tab. 1. Man ersieht daraus, daß eine primäre Zunahme nach Adrenalin in dem der Tabelle zugrunde liegenden Material in etwa 20% der Fälle auftritt. Nach einer zur Zeit laufenden Versuchsserie, bei der die Narkose etwas geändert wurde (Morphin anstatt

Polamivet¹⁾, muß dieser Prozentsatz etwas höher angegeben werden. Bei Registrierung der Durchblutung der intakten Hinterextremität (Muskulatur + Haut) ergibt sich grundsätzlich das gleiche Bild, nur daß hier beim Adrenalin in der Dosis von 0,5—1,0 γ /kg keine anfängliche

Tabelle 1.

	unver- ändert	primäre Zunahme	sekundäre Abnahme	primäre Abnahme	primäre Abnahme mit überlagerter Zunahme
<i>Adrenalin</i>					
0,01—0,1 γ /kg	20%	+56 20%	—31 20%	—30 60%	—
0,2 —0,3 γ /kg	—	9%	9%	27%	—33; +15 64%
0,5 γ /kg	11%	+80 22%	—25 22%	11%	—47; +58 56%
<i>Arterenol</i>					
0,01—0,1 γ /kg	30%	—	—	—38 60%	10%
0,2 —0,3 γ /kg	—	—	—	40%	—42; +14 60%
0,5 γ /kg	—	—	—	27%	—54; +38 73%

Durchblutungsänderung der Skelettmuskulatur der Hinterextremität nach lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol. Die Prozentzahlen bedeuten die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Durchblutungsphasen, die Zahlen über den Prozentzahlen die prozentuale Veränderung der Durchblutung, bezogen auf eine Ausgangsdurchblutung von 100% (z. B. +56 und —31 bedeuten eine Zunahme der Durchblutung um 56% und eine Abnahme derselben um 31%). Aus methodischen Gründen konnte die prozentuale Änderung der Durchblutung nicht immer angegeben werden. Durchschnittswerte aus 18 Versuchen.

Durchblutungssteigerung mehr auftritt (Tab. 2). Die primäre Mehrdurchblutung bei lokaler Adrenalininjektion setzt im Durchschnitt zu derselben Zeit ein wie die primäre Abnahme (nach 14,8 bzw. 15,5 sec), die Häufigkeit des Auftretens nimmt mit steigender Konzentration nicht zu (beides im Gegensatz zur primären Zunahme nach intravenöser Injektion [DÖRNER 1]).

3. In einem großen Teil der Versuche wird bei lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol die primäre Durchblutungsabnahme der Hinterextremitätenmuskulatur durchschnittlich 46 sec nach ihrem Einsetzen von einer mehr oder weniger steil verlaufenden Durchblutungszunahme unterbrochen. Diese Mehrdurchblutung kann teilweise

¹ Zusammensetzung des Polamivets siehe Methodik der vorausgehenden Arbeit.

erheblich über die Ausgangsdurchblutung ansteigen, wie das Beispiel der Abb. 1 zeigt (siehe auch DÖRNER 1 Abb. 2 B).

Man ersieht daraus, wie die Durchblutung der V. fem. d. (die re. Hinterextremität ist enthäutet) nach Injektion von 0,5 γ /kg Adrenalin in die Aorta abd. in Höhe

Tabelle 2.

	unverändert	primäre Zunahme	sekundäre Abnahme	primäre Abnahme	primäre Abnahme mit überlagerter Zunahme
<i>Adrenalin</i>					
0,01—0,1 γ /kg	—	27%	18%	—25 45%	28%
0,5 —1,0 γ /kg	9%	—	—	—80 36%	—54; +54 55%
<i>Arterenol</i>					
0,01—0,1 γ /kg	—	—	—	—37 58%	42%
0,5 —1,0 γ /kg	—	—	—	38%	—70; —16 62%

Durchblutungsänderung der intakten Hinterextremität (Muskulatur und Haut) nach lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol. Vergleiche Legende zu Tab. 1. Durchschnittswerte aus 14 Versuchen.

des Abgangs der A. mesent. inf. zunächst etwas abnimmt, um nach etwa 70 sec in eine stärkere Mehrdurchblutung überzugehen, die nicht ganz auf Ausgangsniveau zurückkehrt. In der Durchblutungskurve der li. intakten Hinterextremität kommt diese Mehrdurchblutung ebenfalls zum Ausdruck, übersteigt aber infolge der Vaso-konstriktion der Hautgefäße nicht die Ausgangsdurchblutung.

In anderen Versuchen ist diese Mehrdurchblutung weniger stark oder sie bleibt unter der Ausgangsdurchblutung, wie in Abb. 2 (nach Arterenol).

Im letzteren Fall handelt es sich nicht um eine echte Durchblutungssteigerung, sondern lediglich um den vorübergehenden Rückgang einer primären Minderdurchblutung (angedeutet auch in DÖRNER 1 Abb. 1E). Diese echte oder unter der Ausgangsdurchblutung bleibende Zunahme lagert sich der Durchblutungsabnahme auf und wird daher von uns als überlagerte Zunahme oder überlagerte Dilatation bezeichnet. ROOME hat auf sie aufmerksam gemacht, sie wurde auch von REIN und SCHNEIDER als „depressorischer Entlastungsreflex“ beschrieben. Sie kann direkt zum Ausgangsvolumen zurückkehren (V. fem. d. der Abb. 1), meist geht sie wieder in eine Minderdurchblutung über, um dann erst zum Ausgangsniveau zurückzu-kehren (V. fem. sin. der Abb. 1; Abb. 2).

Dadurch entsteht eine große Mannigfaltigkeit in den Verlaufsformen der Durchblutungsreaktionen der Muskulatur nach lokaler Injektion von Adrenalin und Arterenol, die noch dadurch vergrößert wird, daß die anfängliche Minderdurchblutung manchmal nur gering, eben angedeutet sein oder in seltenen Fällen auch gänzlich fehlen kann. Letzteres haben wir nur beim Adrenalin gesehen, nicht dagegen beim Arterenol.

Anmerkung zu Abbildung 1 während der Korrektur: die prozentualen Durchströmungsänderungen der V. fem. sin. betragen -51%, -20% und +25% (anstatt -51%, -80% und +125%, wie versehentlich in der Abbildung angegeben).

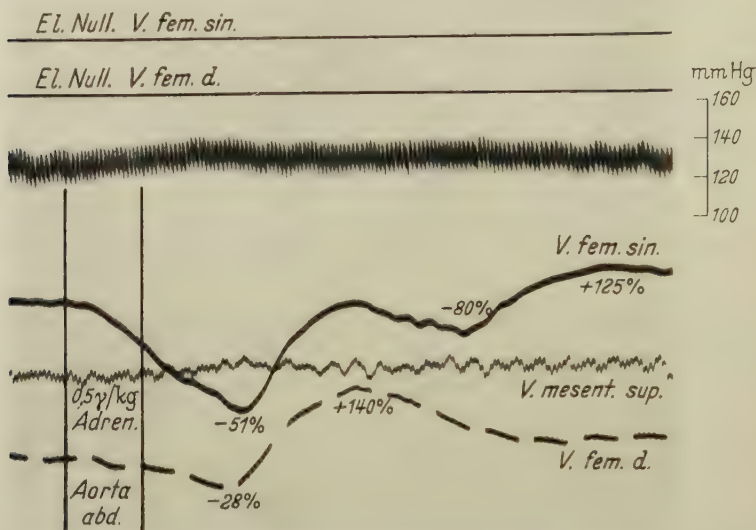


Abb. 1. Hund 13,6 kg. Durchblutungsänderung der Skelettmuskulatur der Hinterextremität (V. fem. d.) und der intakten Hinterextremität (V. fem. sin.) nach Injektion von 0,5 g/kg Adrenalin in die Aorta abd. in Höhe des Abgangs der A. mesent. inf.: in beiden Gefäßgebieten primäre Abnahme der Durchblutung mit folgender Zunahme, die in der V. fem. d. stark über Ausgangsvolumen ansteigt, im intakten Bein (V. fem. sin.) dagegen nur das Ausgangsvolumen erreicht, um dann wieder etwas abzunehmen. Es handelt sich bei der Zunahme um eine überlagerte Zunahme. Vgl. Abb. 4 d und e und Text. Zeitschreibung 20 sec (gilt auch für die folgenden Abbildungen). V. fem. d.: Elem. Typ N, $\alpha = 0,23$; V. fem. sin.: Elem. Typ A, $\alpha = 0,52$.

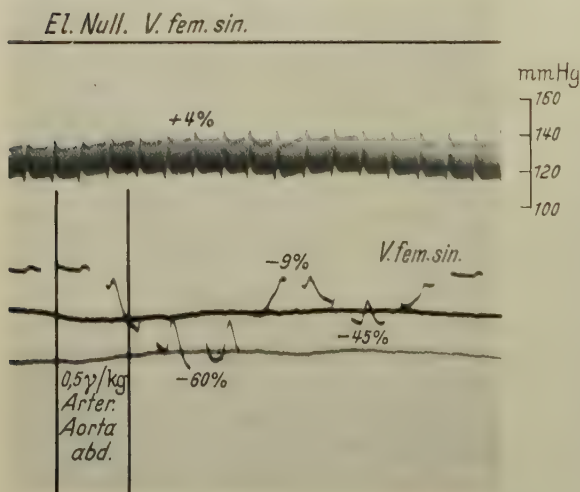


Abb. 2. Hund 14,0 kg. Durchblutungsänderung der V. fem. sin. (unterbrochene Kurve) nach Injektion von 0,5 g/kg Arterenol in die Aorta abd. in Höhe des Abgangs der A. mesent. inf. Die beiden anderen Kurven geben die Durchblutung der A. carotis com. und A. carotis int. wieder. In der V. fem. sin. überlagerte Zunahme, die aber im Gegensatz zur Abb. 1 unter der Ausgangsdurchblutung bleibt. Vgl. Abb. 4 d und Text. Während der überlagerten Zunahme geringer Rückgang des durch die periphere Vasokonstriktion bedingten Blutdruckanstieges. V. fem. sin.: Elem. Typ N, $\alpha = 0,41$.

In Abb. 3 wird eine überlagerte Mehrdurchblutung nach 0,1 γ /kg Adrenalin gezeigt (A. fem. d. der enthäuteten Extremität), die nach kurzer, geringer Durchblutungsabnahme etwas früher, als dies im allgemeinen der Fall ist, einsetzt und nicht so charakteristisch ist wie in den Abb. 1 und 2, da sie nur allmählich auf die Ausgangsdurchblutung zurückkehrt. In der Durchblutungskurve der intakten Hinterextremität (A. fem. sin.) kommt sie nur angedeutet zum Ausdruck.

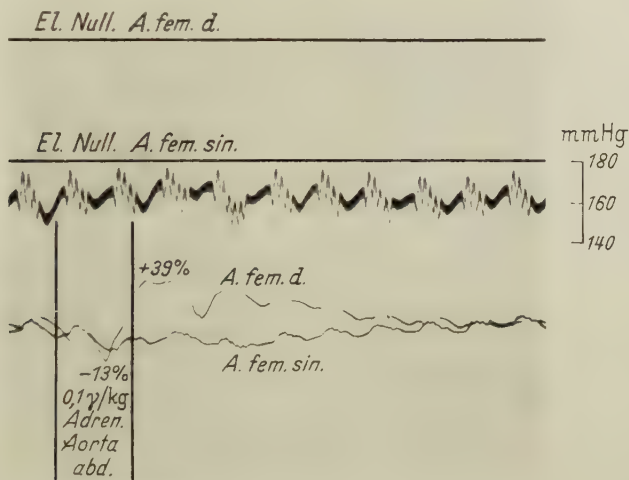


Abb. 3. Hund 9,5 kg. Durchblutungsänderung der A. fem. d. (Extremität enthäutet) und A. fem. sin. nach Injektion von 0,1 γ /kg Adrenalin in die Aorta abd. in Höhe des Abgangs der A. mesent. inf. Nach kurzer geringer Durchblutungsabnahme in der A. fem. d. vorzeitig einsetzende überlagerte Zunahme, die allmählich auf die Ausgangsdurchblutung zurückkehrt (vgl. Abb. 4 h). In der intakten Extremität (A. fem. sin.) ist die überlagerte Zunahme ebenfalls vorhanden, bleibt aber unter Ausgangsniveau. Siehe auch Text. A. fem. d.: Elem. Typ A, $\alpha = 0,52$, A. fem. sin.: Elem. Typ A, $\alpha = 0,5$.

Die initiale Minderdurchblutung kann in solchen Fällen leicht übersehen oder nicht beachtet werden; die Reaktion wird dann als Mehrdurchblutung bzw. Dilatation gewertet. Doch weist gerade die anfängliche Durchblutungsabnahme darauf hin, daß es sich hier um eine prinzipiell andere Reaktion handelt als z. B. bei intravenöser Injektion.

Wir geben in Abb. 4 eine schematische Übersicht über die hauptsächlichsten Durchblutungsreaktionen der Skelettmuskelgefäße nach lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin. Aus den Abb. 4 c und d geht die Überlagerung der Mehrdurchblutung deutlich hervor, während sie in den Abb. 4 e—h in nicht so ausgeprägter Form in Erscheinung tritt. Der zugrunde liegende Mechanismus ist in den Abb. 4 c—h jedoch prinzipiell gleich. Die Reaktionsformen der Abb. 4 gelten auch für Arterenol mit Ausnahme der Abb. 4 b und h, die wir beim Arterenol nicht beobachtet haben. Zwischen den einzelnen Verlaufsmöglichkeiten bestehen fließende Übergänge.

Eine summarische Darstellung unserer Ergebnisse, die die Häufigkeit des Auftretens der überlagerten Mehrdurchblutung sowie ihr Ausmaß und die Stärke der primären Minderdurchblutung berücksichtigt, findet sich in der letzten Spalte der Tab. 1 bei Messung der Skeletmuskeldurchblutung und in Tab. 2 bei Registrierung der Durchblutung der intakten

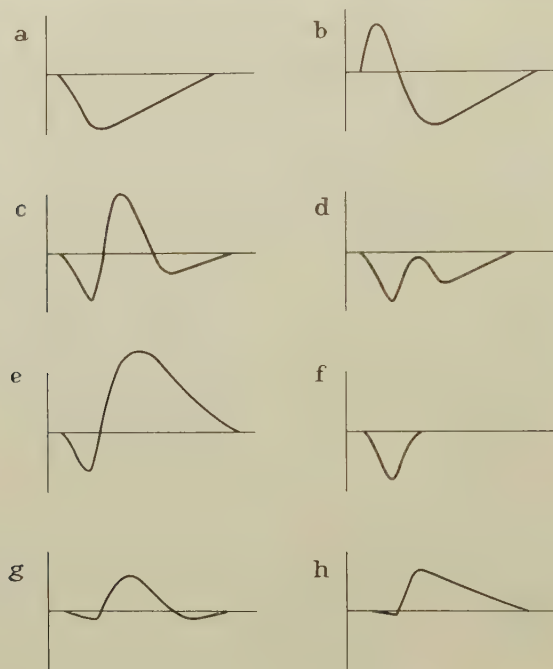


Abb. 4. Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Änderungen der Skeletmuskeldurchblutung der Hinterextremität nach lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin. *a* Reine Durchblutungsabnahme; *b* primäre Durchblutungszunahme mit sekundärer Durchblutungsabnahme; *c*–*h* die verschiedenen Formen der Durchblutungskurve bei Vorhandensein einer überlagerten Mehrdurchblutung. Einzelheiten siehe Text.

Hinterextremität (Muskulatur + Haut). Bei der kleinsten von uns gewählten Dosis von 0,01–0,1 γ /kg ist die überlagerte Zunahme kaum vorhanden, dagegen in einem hohen Prozentsatz schon bei der Dosierung von 0,2–0,3 γ /kg. Sie nimmt mit steigender Dosis an Intensität zu und findet sich auch beim Arterenol. Bei letzterem ist die primäre Minderdurchblutung stärker und die überlagerte Zunahme etwas schwächer als beim Adrenalin. Auffallend ist, daß auf Tab. 2 schon bei der Dosis von 0,01–0,1 γ /kg die überlagerte Mehrdurchblutung relativ häufig auftritt. Die überlagerte Zunahme dauert in Abhängigkeit von der Dosierung beim Adrenalin durchschnittlich 80–140 sec, beim Arterenol 50–65 sec. Auch hieraus ergibt sich, daß sie beim Arterenol weniger ausgeprägt ist.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Tab. 1 mit denjenigen bei intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol (DÖRNER 3 Tab. 3) ergibt, daß bei letzterer Injektionsart die überlagerte Zunahme beim Adrenalin nur selten und beim Arterenol überhaupt nicht auftritt. Darüberhinaus zeigt ein Vergleich der beiden Tabellen, daß bei intravenöser Injektion von Adrenalin die überlagerte Zunahme bei der kleinsten Dosis am häufigsten in Erscheinung tritt (in 12% der Fälle), um mit steigender Dosis an Häufigkeit abzunehmen (bei 0,5 γ /kg in noch 5% der Fälle, bei 1,0 γ /kg fehlt sie), während bei lokaler intraarterieller Injektion das Umgekehrte der Fall ist. Dieses zunächst merkwürdig erscheinende Verhalten wird verständlich, wenn man bedenkt, daß bei intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol fast immer eine primäre Durchblutungszunahme erfolgt und daß, wie aus der Tab. 3 (Spalte 3 und 6) der angeführten Arbeit zu entnehmen ist, die Häufigkeit des Auftretens einer überlagerten Zunahme bei intravenöser Injektion von Adrenalin sich umgekehrt verhält wie die Häufigkeit des Auftretens einer primären Durchblutungszunahme; d. h. während mit steigender Dosierung des Adrenalins die primäre Zunahme häufiger auftritt, um bei 1,0 γ /kg fast immer vorhanden zu sein, nimmt mit zunehmender Dosis die an sich schon geringe Häufigkeit der überlagerten Zunahme ab, um bei 1,0 γ /kg ganz zu fehlen.

4. Im Anschluß an die Durchblutungsabnahme kann es sowohl bei intravenöser als auch bei intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol zu einer Durchblutungszunahme von wechselnder Stärke und unterschiedlicher Dauer kommen, die oft beschrieben und besonders auf Grund der Arbeiten von REIN und seiner Schüler als reaktive oder postoligämische Hyperämie bekannt ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Lassen wir die zuletzt genannte reaktive Hyperämie außer Betracht, da sie nicht ein Charakteristikum der Adrenalinwirkung darstellt, so können wir 3 Arten der Dilatation der Muskelgefäße nach Injektion von Adrenalin unterscheiden, denen jeweils ein verschiedener Mechanismus zugrunde liegen muß (daß es sich in allen Fällen um eine aktive Dilatation handelt, ergibt sich aus der gleichzeitigen Beobachtung des Blutdrucks):

1. Die primäre Dilatation nach intravenöser Injektion. Sie tritt nach Arterenol in gleicher Weise und in gleichem Ausmaß auf wie nach Adrenalin und ist die Folge eines nerval vermittelten Vorgangs, dessen Ursachen wir eingehend an anderer Stelle diskutiert haben (DÖRNER 1). Wir bezeichnen sie als *neurogene Dilatation*.

2. Die primäre Dilatation nach lokaler intraarterieller Injektion. Sie unterscheidet sich von der unter 1. genannten dadurch, daß sie nicht so

häufig auftritt wie die Dilatation bei intravenöser Injektion, daß sie nur beim Adrenalin vorhanden ist, niemals dagegen beim Arterenol, daß die Häufigkeit ihres Auftretens mit steigender Dosierung nicht zunimmt und daß sie im Durchschnitt zu derselben Zeit einsetzt wie die primäre Gefäßkonstriktion. Damit ist sie hinreichend von der neurogenen Dilatation abgegrenzt; sie wird von uns *primär-lokale Dilatation* benannt.

Über die Ursache dieser Dilatation können wir auf Grund unserer Versuche keine Aussagen machen. ROOME fand, daß die primär-lokale Dilatation vornehmlich bei hohen Durchflußwerten auftrat, woraus er folgerte, daß sie sich in den Capillaren ereignet, während die Konstriktion die Arteriolen betrifft, wie dies auch CLARK und DALE und RICHARDS vermuteten. Auf weitere Erklärungsversuche ist an anderer Stelle hingewiesen (DÖRNER 1).

Es ist jedoch die Frage, ob man dieser primär-lokalen Adrenalin-dilatation große Bedeutung beimessen und vor allem in ihr einen spezifischen Adrenalineffekt sehen soll, da ein großer Teil von Substanzen bei lokaler intraarterieller Injektion zu einer primären Gefäßdilatation führt (HARTMANN, EVANS u. WALKER). Wir selbst konnten uns davon überzeugen, daß die typische Reaktion der Muskelgefäße auf pharmakologische Reize bei intraarterieller Injektion meist in einer Dilatation besteht.

Selbst bei intraarterieller Injektion physiologischer Kochsalzlösung kommt es nicht selten vor, daß 10—15 sec nach Injektionsbeginn eine Gefäßdilatation einsetzt, die bei MERCKER und bei McDOWALL schon Erwähnung findet. Diese NaCl-Dilatation wie auch die primär-lokale Adrenalindilatation konnten in eigenen orientierenden Versuchen durch vorhergehende lokale intraarterielle Acetylcholininjektion verstärkt oder erst hervorgerufen werden. KESTER, RICHARDSON und GREEN zeigten, daß die intraarterielle Injektion von 1 ml isotonischer Kochsalzlösung bei p_H 7,4 Dilatation im Aufspaltungsgebiet der A. fem. bewirkt, und daß Änderungen des p_H nach der einen oder anderen Seite mit zunehmender Abweichung von 7,4 zu immer stärkerer Dilatation der Hinterextremitätengefäße führen.

Es muß somit als sehr fraglich angesehen werden, ob es berechtigt ist, für die primär-lokale Adrenalindilatation besondere spezifische Mechanismen anzunehmen, da die Dilatation nicht auf das Adrenalin oder verwandte Körper beschränkt ist, sondern offenbar ein allgemeines Phänomen bei lokaler Injektion nicht ausgesprochen stark constrictorisch wirkender Substanzen darstellt. Offen muß dabei bleiben, warum sie beim Arterenol nicht auftritt. Diese primär-lokale Adrenalindilatation spielt bei intravenöser Injektion keine Rolle, da in diesem Fall die neurogene Dilatation die lokale Dilatation an ihrem Entstehen verhindert oder sie nicht in Erscheinung treten läßt. Möglicherweise kommt es bei intravenöser Injektion auch ohne den neurogenen Dilatationsmechanismus überhaupt nicht zu einer primär-lokalen Dilatation, da bei dieser Injektionsart auch nach physiologischer Kochsalzlösung keine periphere Dilatation erfolgt.

3. Die *überlagerte Dilatation*. Bei ihr handelt es sich im Gegensatz zur primär-lokalen Dilatation um eine spezifische Adrenalin- und Arterenol-

wirkung, die fast immer erst nach einer initialen Vasokonstriktion einsetzt und sich dadurch wie auch hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens in typischer Weise von der neurogenen Dilatation unterscheidet. Sie bewirkt, da sie sich der constrictorischen Adrenalin- und Arterenolwirkung gegenüber durchzusetzen vermag, die verschiedensten Verlaufsformen der Durchblutungskurve nach lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol (siehe Abb. 4). Da mitunter die initiale Vasokonstriktion nur geringfügig ist, kann bei Verwendung von Methoden, die den Verlauf der Durchblutung nicht in jedem Zeitpunkt erfassen oder auch sonst bei Übersehen, Nichtbeachtung oder relativ schwacher Ausbildung der vorangehenden Durchblutungsabnahme diese überlagerte Dilatation als der einzige Adrenalineffekt oder die Hauptwirkung erscheinen und entsprechend bewertet werden, obwohl sie mit den beiden unter 1. und 2. aufgezeigten Dilatationsmechanismen nicht gleichgestellt werden darf.

Hinsichtlich der Ursache dieser überlagerten Dilatation können wir auf Grund unserer Versuche nur wenig Aussagen machen. ROOME möchte die überlagerte Dilatation auf dieselbe Ursache zurückführen wie die primär-lokale Dilatation, nämlich eine Dilatation der Capillaren, die in den Fällen als überlagerte Dilatation in Erscheinung treten soll, in denen die Blutströmung relativ langsam ist. Wir glauben auf Grund der Tatsache, daß die überlagerte Dilatation auch beim Arterenol auftritt, wenn auch schwächer als beim Adrenalin, die primär-lokale Dilatation dagegen nicht, diese Möglichkeit ausschließen zu müssen. Es spricht auch gegen eine solche Deutung, daß die überlagerte Durchblutungszunahme in der venösen Durchblutungskurve ebenso zum Ausdruck kommt wie in der arteriellen; ferner der in den Abb. 1 und 2 erkennbare Befund, daß der Blutdruck während der überlagerten Dilatation eine wenn auch nicht sehr starke Senkung aufweist. REIN und SCHNEIDER erklären die überlagerte Dilatation als depressorischen Entlastungsreflex. Wir können uns dem nicht anschließen, da es sich bei der überlagerten Dilatation um ein rein peripheres Geschehen handelt. Ob die überlagerte Dilatation nun als die Folge einer Stoffwechselwirkung anzusehen ist oder ob ihr Reflexwirkungen im Sinne der FLEISCHSchen Axonreflexe zugrunde liegen oder ob sonst ein anderer Mechanismus ursächlich eine Rolle spielt, läßt sich ohne weitere experimentelle Bearbeitung nicht klären. Es darf hier nur darauf hingewiesen werden, daß sie bei intravenöser Injektion, bei der es zu einer primären Dilatation im Sinne der neurogenen Dilatation kommt, nicht oder nur selten in Erscheinung tritt.

Konnten wir somit zeigen, daß der Dilatation nach intravenöser und lokaler intraarterieller Adrenalininjektion verschiedenartige Dilatationsmechanismen zugrunde liegen, deren Ursachen noch als umstritten angesehen werden müssen, so ergibt sich als Folgerung aus unseren Ergebnissen, künftighin die Art der Dilatation näher anzugeben. Nicht zuletzt dürfte in der Tatsache, daß allgemein nur von *der* Adrenalindilatation gesprochen wird, die Ursache dafür liegen, daß die Meinungen über das Zustandekommen dieser Dilatation so sehr auseinandergehen und sich teilweise widersprechen. Bis zu einer weiteren ursächlichen Klärung schlagen wir die von uns verwandten Bezeichnungen: neurogene,

primär-lokale und überlagerte Dilatation vor, bei denen nur die erstere, da sie mit Sicherheit auf nervalem Wege erfolgt, etwas über die Ursache aussagt, während die beiden anderen Bezeichnungen rein deskriptiv sind.

Da die Reaktion der Coronargefäße ähnlich derjenigen der Skelet-muskelgefäße ist, dürfte eine Übertragung obiger Ergebnisse auf die Verhältnisse des Coronarstrombettes nicht prinzipiell falsch sein.

Experimentell konnten wir feststellen, daß eine der neurogenen Dilatation der Skeletmuskelgefäße analoge neurogene Komponente auch bei der Dilatation der Coronargefäße nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol beteiligt ist (DÖRNER 2). Versuche mit direkter Injektion von Adrenalin und teilweise auch Arterenol in die Coronararterien (DENISON, LAWRENCE u. GREEN; ECKENHOFF, HAFKENSCHIEL u. LANDMESSER; ECKSTEIN, NEWBERRY u. MCEACHEN; FOLKOW, FROST u. UYNÄS; WINBURY, MICHELIS u. GREEN) ergaben, daß auch bei dieser Injektionsart eine Mehrdurchblutung der Coronararterien resultiert, deren Beurteilung durch eine gleichzeitige Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens oder der Herzfrequenz unsicher werden kann. In Analogie zu dem Verhalten der Skelet-muskelgefäße nach lokaler intraarterieller Injektion von Kochsalzlösung fanden ECKSTEIN u. Mitarb., daß auch die Durchblutung der Coronararterien nach direkter intraarterieller Injektion von Kochsalzlösung, Blut oder Plasma zunimmt. Damit wird eine Unterscheidung der einzelnen Dilatationsmechanismen an den Herzkranz-gefäßen sehr erschwert, wobei noch hinzukommt, daß bei der infolge der dauernden Tätigkeit des Herzens ausgesprochen geringen constrictorischen Reaktionsbereitschaft der Coronargefäße eine initiale constrictorische Phase fast immer fehlt oder durch sekundäre Einflüsse verdeckt wird.

Zusammenfassung.

An 53 Hunden in Polamivet-Pernocton-Narkose wurde mit Hilfe der Diathermie-Thermostromuhr nach REIN die Durchblutung der Skelet-muskulatur der Hinterextremität und der intakten Hinterextremität (Muskulatur + Haut) nach intravenöser und lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol (0,01—1,0 γ /kg) gemessen. Dabei konnten verschiedene Arten der Dilatation der Skeletmuskelgefäße unterschieden werden, denen jeweils ein anderer Dilatationsmechanismus zugrunde liegt:

1. Eine primäre Dilatation bei intravenöser Injektion, die fast immer vorhanden und beim Arterenol ebenso stark wie beim Adrenalin ist. Sie kommt auf nervalem Wege zustande: *neurogene Dilatation*.

2. Eine primäre Dilatation bei lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin. Sie tritt nur in einem Teil der Fälle auf und fehlt immer beim Arterenol. Sie wird von uns als *primär-lokale Dilatation* bezeichnet. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Dilatation um keinen spezifischen Adrenalineffekt.

3. Eine Dilatation bei lokaler intraarterieller Injektion von Adrenalin und Arterenol, die sich von den beiden erwähnten Dilatationen dadurch unterscheidet, daß sie erst nach einer initialen Durchblutungsabnahme

einsetzt und sich der Gefäßkonstriktion gleichsam überlagert: *überlagerte Dilatation*. Bei intravenöser Injektion tritt diese überlagerte Dilatation nur beim Adrenalin in seltenen Fällen auf.

4. Eine Dilatation von wechselnder Stärke und Dauer im Anschluß an die constrictorische Phase, die als reaktive Hyperämie bekannt ist und keine spezifische Adrenalin- oder Arterenolwirkung darstellt.

Die Ergebnisse werden auch im Hinblick auf die Reaktionsweise der Coronararterien diskutiert; auch hier ist es verfehlt, allgemein nur von der Adrenalindilatation zu sprechen.

Literatur.

- ALLEN, W. J.: The action of adrenaline, ephedrine and methedrine on the circulation in man. *Clin Sci. London* **6**, 269 (1948). — BINET, L., et M. BURSTEIN¹. — BÜLBING, E., and J. H. BURN: The sympathetic dilator fibres in the muscles of the cat and dog. *J. of Physiol.* **83**, 483 (1935). — BURN, J. H., and D. E. HUTCHESON: The action of noradrenaline. *Brit. J. Pharmacol.* **4**, 373 (1949). — CLARK, G. A.: The vasodilator action of adrenaline. *J. of Physiol.* **80**, 429 (1934). — Adrenaline vaso-dilatation in voluntary muscle. *J. of Physiol.* **84**, 344 (1935). — DALE, H. H., and A. N. RICHARDS: The vasodilation action of histamine and of some other substance. *J. of Physiol.* **52**, 110 (1918). — The depressor (vasodilator) action of adrenaline. *J. of Physiol.* **63**, 201 (1927). — DENISON jr., A. B., B. J. LAWRENCE jr. and H. D. GREEN: Effects of epinephrine, ephedrine and 1-(m-hydroxyphenyl)-N²-methylethylene diamine (NU-1683) on the coronary blood flow. *Fed. Proc.* **8**, 286 (1949). — DÖRNER, J.: (1) Zur Ursache der primären Mehrdurchblutung der Skelettmuskulatur nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. *Pflügers Arch.* **257**, 464 (1953). — (2) Zur Ursache der Mehrdurchblutung der Coronararterien nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. *Pflügers Arch.* **257**, 480 (1953). — (3) Ist die auf nervalem Wege ausgelöste Gefäßdilatation nach intravenöser Injektion von Adrenalin und Arterenol die Folge einer Hemmung des Sympathikotonus? *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 273 (1954). — McDOWALL, R. J. S.: The responses of the blood vessels of the muscles with special reference to their central control. *J. of Physiol.* **111**, 1 (1950). — DUFF, R. S., and H. J. C. SWAN: Further observations on the effect of adrenaline on the blood flow through human skeletal muscle. *J. of Physiol.* **114**, 41 (1951). — ECKENHOFF, J. E., J. H. HAFKENSCHIEL and C. M. LANDMESSER: The coronary circulation in the dog. *Amer. J. Physiol.* **148**, 582 (1947). — ECKSTEIN, R. W., J. CHAMBLISS, J. DEMMING and K. WELLS: Coronary vasodilation following intracoronary injections. *Fed. Proc.* **9**, 36 (1950). — ECKSTEIN, R. W., W. NEWBERRY and J. McEACHEN: Effects of nitroglycerine on myocardial oxygen consumption in dog. *Fed. Proc.* **10**, 38 (1951). — FOLKOW, B., J. FROST and B. UVNÄS: Action of acetylcholine, adrenaline and nor-adrenaline on the coronary blood flow of the dog. *Acta Physiol. Scand.* **17**, 201 (1949). — GAYET, R., TH. GAYET et M. GUILLAUMIE¹. — GRANDPIERRE, R., C. FRANCK, R. LEMAIRE et P. BOUVEROT: Mécanisme des modifications de l'action vasomotrice de l'adrénaline sous l'influence de l'anoxémie hypocapnique. *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **143**, 434 (1949). — GROSS, F.: Periphere Gefäßwirkung von Adrenalin und Noradrenalin. *Helvet. physiol. Acta.* **7**, C 43 (1949). — GRUBER, CH. M.: Further studies on the effect of adrenalin upon muscular fatigue and limb circulation. *Amer. J. Physiol.* **42**, 610 (1917). — Further studies on the effect of adrenalin upon muscular fatigue. *Amer. J. Physiol.* **43**, 530 (1917). — Further studies on the effect of adrenalin upon the blood flow in muscle. *Amer. J. Physiol.* **45**, 302 (1918). — HARTMANN, F. A., J. I. EVANS

and H. G. WALKER: Control of capillaries of skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* **90**, 668 (1929). — HARTMANN, F. A., and L. FRASER¹. — HARTMANN, F. A., L. G. KILBORN and L. FRASER: Adrenalin vasodilator mechanisms. *Amer. J. Physiol.* **46**, 502 (1918). — HOCHREIN, M., u. J. KELLER¹. — IMIG, CH. J., G. F. RANDALL and H. M. HINES: Effects of epinephrine and nor-epinephrine on blood flow through normal and denervated limbs of dogs. *Amer. J. Physiol.* **169**, 22 (1952). — KESTER, N. C., A. W. RICHARDSON and H. D. GREEN: Effect of controlled hydrogen-ion concentration on peripheral vascular tone and blood flow in innervated hind leg of the dog. *Amer. J. Physiol.* **169**, 678 (1952). — KLEINSORG, H., u. J. SCHMIER: Künstliche Veränderungen der Drosselungstoleranz im Gefäßsystem des quergestreiften Muskels. *Pflügers Arch.* **254**, 430 (1952). — MEIER, R., u. F. GROSS: Analyse der nach Adrenalininjektion auftretenden Durchblutungsreaktion verschiedener Gefäßgebiete. *Helvet. physiol. Acta* **8**, 424 (1950). — MERCKER, H.: Über die Interferenz der lokal dilatatorischen Wirkung des Acetylcholins mit zentralnervöser Vasokonstriktion im peripheren Gefäßnetz. *Pflügers Arch.* **247**, 336 (1943). — PUCCINELLI, E.: Sopra alcune modificazioni del deflusso venoso femorale per iniezione di adrenalina. Considerazioni sulla partecipazione del circolo femorale ad alcuni fenomeni vasomotori. *Riv. Pat. sper.*, N. s. **1**, 261 (1934); zit. nach *Ber. Physiol.* **80**, 657 (1934). — REIN, H., u. M. SCHNEIDER: Die Physiologie der Skeletmuskeldurchblutung. II. Mitteilung: Die Interferenzen verschiedener Regulationen im Muskelgefäßnetz. *Z. Biol.* **91**, 13 (1931). — ROOME, N. W.: The effects of intra-arterial epinephrine on the blood flow in an extremity. *Amer. J. Physiol.* **123**, 543 (1938). — SWAN, H. J. C.: Observations on a central dilator action of adrenaline in man. *J. of Physiol.* **112**, 426 (1951). — TOURNADE, A.¹. — TOURNADE, A., et J. MALMÉJAC¹. — WINBURY, M. M., P. M. MICHELIS and D. M. GREEN: Studies on the nervous and humoral control of coronary circulation. *Fed. Proc.* **9**, 325 (1950).

¹ Vgl. Literaturverzeichnis der voranstehenden Arbeit.

Dozent Dr. med. J. DÖRNER, Pharmakol. Institut der Med. Akademie Gießen,
z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. KUSCHINSKY).

Beitrag zur pharmakologischen Analyse der Muskelwirkung des Salyrgan und anderer thiolopriven Substanzen.

Von

G. KUSCHINSKY und H. LÜLLMANN.

(Eingegangen am 5. Oktober 1953.)

In unserer Mitteilung über den Einfluß des 3-Oxymercuri-2-methoxypropylamids des Salicylsäureglykolsäureäthers = Salyrgan auf das Rattenzwerchfell (KUSCHINSKY, MERCKER, WESTERMANN u. LÜLLMANN) hatten wir über die sehr komplizierte Wirkung dieser Substanz berichtet und uns jeder Stellungnahme zu dem Mechanismus enthalten. Wir setzten unsere Untersuchungen über diesen Gegenstand unter 2 Gesichtspunkten fort: Einerseits strebten wir eine Analyse der Salyrganwirkung an, um die verschiedenen Effekte des Salyrgan an der Skelettmuskulatur charakterisieren zu können. Wir hofften, damit Anschluß an die biochemischen Befunde und eventuell an die klinische Toxikologie der Quecksilberdiuretica zu bekommen. Andererseits schien uns die Frage von Interesse zu sein, ob die von uns für das Salyrgan beschriebenen Wirkungen auch anderen thiolopriven Substanzen eigen sind oder ob das Salyrgan eine Sonderstellung einnimmt.

Methodik.

Im Vergleich zum Salyrgan¹ untersuchten wir folgende thioloprive Substanzen: Monojodessigsäure, Jod in Form der LUGOLSCHEN Lösung, Malëinsäure, Malëinsäureäthylimid, Kupferglykokoll und salzsaures 3-Amino-4-oxybenzol-1-arsenoxyd = Oxarsan¹. Weiterhin wurden benutzt: Eserin, Prostigmin, Veratrin, Cystein, Kaliumchlorid, Calciumchlorid und für die Cholinesterase als Substrat Acetylcholinchlorid¹.

Wie in der ersten Mitteilung über die Salyrganwirkung arbeiteten wir am isolierten Rattenzwerchfell in isotonischer und isometrischer Anordnung. Die Reizung und Ableitung der Aktionspotentiale erfolgte ebenfalls in schon angegebener Weise. Die Messung der Cholinesteraseaktivität wurde manometrisch vorgenommen (WARBURG-Apparatur und mittels der auf dem Prinzip des Kartesianischen Tauchers nach LINDERSTRÖM-LANG und HOLTER beruhenden Anlage). Als Fermentquellen dienten: Serum und Erythrocyten des Menschen und das Zentrifugat homogenisierter Rattenmuskulatur und des Kaninchenhirnes.

¹ Salyrgan und Oxarsan wurde uns freundlicherweise von den Farbwerken Hoechst, Frankfurt-Höchst, und das Acetylcholin von der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G., Grenzach/Baden, zur Verfügung gestellt.

Die Denervierung des Zwerchfelles wurde in Evipan-Narkose (15 mg Natrium N-methyl-cyclohexenyl-methylbarbituricum/100 g Ratte intraperitoneal) durchgeführt. Der Hals wurde paramedian durch einen 10 mm langen Hautschnitt eröffnet, von dort der Nervus phrenicus bei seinem Austritt aus dem Plexus cervicalis und seinem Abgang vom Plexus brachialis aufgesucht und ein 10–15 mm langes Stück herausgezogen. Bis zur Benutzung des Muskels wurde mindestens 14 Tage gewartet.

In einem Modellversuch prüften wir den Einfluß der thiolopriven Verbindungen auf die Kaliumabgabe der Erythrocyten. Methodisch gingen wir dabei folgendermaßen vor: Frisches, defibriniertes menschliches Blut wurde mit den zu untersuchenden Substanzen, die in RINGER-Lösung gelöst wurden, versetzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zur Zeit 0, 2 Std und 5 Std wurden aliquote Teile entnommen, scharf zentrifugiert und in dem so gewonnenen Serum der Kaliumgehalt nach BREH und GAEBLER bestimmt. Die Übertragung dieses Versuches auf das Rattenzwerchfell geschah auf folgendem Wege: Ein halbes Zwerchfell wurde, ebenso wie für das „BÜLBRING-Präparat“, eingespannt. Um die Verdünnung des austretenden Kaliums möglichst gering zu halten, reduzierten wir das Badvolumen auf 2 ml. Die Bestimmung des Kaliums erfolgte mit dem BECKMAN-Flammenphotometer in Badproben, die in 2-minütigen Abständen vor und nach dem Salyrganzusatz entnommen wurden¹. Die aus dem Muskelbad abgesaugte Flüssigkeitsmenge wurde jeweils wieder ersetzt, so daß das Zwerchfell ständig in 2 ml Tyrodelösung suspendiert war. Da das Rattenserum einen Kaliumgehalt von etwa 17 mg% aufweist, erhöhten wir die Menge der Kaliumionen in der Tyrodelösung auf diesen Wert. In Vorversuchen zeigte sich, daß der Muskel unter diesen Bedingungen nur sehr geringe Kaliumverluste erleidet. Das gleichzeitig isotonisch registrierte Mechanogramm gestattete es, die Salyrganwirkung auf den Kontraktionszustand des Muskels und das zeitliche Verhalten des Kaliumaustrittes und der Kontraktur zu beobachten.

Versuchsergebnisse.

A. *Fibrillationen und Aktionspotentiale.* Über die Dosierung der geprüften thiolopriven Substanzen wird unter D berichtet. In keinem Falle konnten wir Fibrillationen registrieren. Der gleichzeitige Versuch, Aktionspotentiale abzugreifen, schlug ebenfalls fehl. Wurden dagegen Salyrgan, Eserin ($1 : 5 \cdot 10^4$) oder Prostigmin ($1 : 5 \cdot 10^4$ — $1 : 10^5$) dem Bade zugesetzt, so konnten die genannten mechanischen und elektrischen Vorgänge aufgezeichnet werden.

Eine Wiederholung dieser Versuche mit Salyrgan und Eserin am „chronisch denervierten“ Zwerchfell ergab ein Ausbleiben von Fibrillationen und Membranpotentialschwankungen.

Die Prüfung des Einflusses, den Salyrgan und die anderen SH-Gruppen-blockierenden Substanzen auf die *Cholinesterase* ausüben, zeigte folgendes Ergebnis: Die Hemmung der Pseudoesterase des Serums begann mit 0,001 m Salyrganlösung und wurde bei 0,01 m vollständig: die entsprechenden Grenzen lagen für Salyrgan an der Esterase aus Erythrocyten, Rattenmuskulatur und Kaninchenhirn bei 0,002 m und

¹ Herrn Dr. H. BRUNNER danken wir für die flammenphotometrischen Kaliumbestimmungen.

0,01 m Lösungen, während Malëinsäure bis 0,1 m, Malëinsäureäthylimid bis 0,01 m, Monojodessigsäure und Kupferglykokoll ebenfalls bis 0,01 m keine Hemmung der Serum- und Erythrocytenesterase verursachten. Lediglich Oxarsan zeigte eine beginnende Hemmung der Erythrocytenesterase bei 0,004 m Lösung.

B. *Verzögerte Erschlaffung*. Weder Monojodessigsäure noch Kupferglykokoll erzeugten im Gegensatz zu Salyrgan eine Verlängerung der Erschlaffungsphase einer elektrisch ausgelösten Kontraktion. Die untersuchten Konzentrationen deckten sich mit den unter D angegebenen. In einigen Fällen waren Eserin und Prostigmin in der Lage, diesen Effekt hervorzurufen. Kalium-Ionen wechselnder Menge beeinflussten die Erschlaffungsphase des gereizten Muskels nicht.

Am chronisch denervierten Muskel verloren Salyrgan und die Cholinesterasehemmstoffe ihre Fähigkeit, den Charakter der Erschlaffung zu verändern.

Ein Vergleich der durch Salyrgan bedingten Verzögerung der Erschlaffung mit dem Veratrineffekt ergab eine Identität der Veränderungen im Mechanogramm. Das Verhältnis gleich wirksamer Dosen von Veratrin und Salyrgan lag bei 1:50 — 1:100.

C. „*Erster Anstieg*“. Ebenso wie Salyrgan verursachte Kupferglykokoll ($1:2 \cdot 10^3$ — $1:5 \cdot 10^3$) den Tonusanstieg, der 2—4 min nach dem Zufügen der genannten Substanzen zur Badflüssigkeit auftrat und durch Calciumionen kurzfristig zu durchbrechen war. Monojodessigsäure, Malëinsäure, deren Äthylimid und Oxarsan besaßen diese Eigenschaft nicht. Kaliumchlorid (um $1:10^3$) führte zu einem vergleichbaren Tonusanstieg, der ebenfalls durch Calcium aufhebbar war. Aktionspotentiale konnten bei dieser Verkürzung bzw. Spannungsentwicklung des Muskels niemals abgeleitet werden. Die Versuche, die am denervierten Muskel unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, ergaben dieselben Befunde wie am intakten Muskel.

Die Beeinflussung der *Kaliumabgabe der Erythrocyten* im defibrinierten Blut durch thioloprive Substanzen zeigte folgende Ergebnisse: Salyrgan 0,0001 m ergab bereits ein langsames Ansteigen der Kaliumwerte im Serum, 0,001 m erzeugte eine Zunahme des Kaliumgehaltes von etwa 20 mg% auf 70 mg% KCl nach 5 Std, während in den Kontrollversuchen kein merklicher Anstieg nachzuweisen war. 0,001 m Cystein hemmte diesen Salyrganeffekt, 0,005 m Cystein hob ihn völlig auf. Auch nach 2 Std den salyrganvergifteten Erythrocyten zugesetztes Cystein führte in 0,005 molarer Konzentration zu einem Abstoppen der Salyrganwirkung. Monojodessigsäure, Malëinsäure und Oxarsan (jeweils 0,001 m) waren ohne jeden Einfluß auf die Kaliumabgabe der Erythrocyten, während Kupferglykokoll (0,001 m) eine angedeutete, bei 0,005 m eine deutliche Wirkung aufwies.

Die Bestimmung des *Kaliumverlustes des Zwerchfelles* bei gleichzeitiger Registrierung des Mechanogrammes ergab eine stark gesteigerte Abgabe von Kaliumionen nach Salyrganzusatz. Die Größe des Kaliumverlustes pro Zeiteinheit ging dabei der Verkürzung des Muskels während dieser Zeit in den meisten Versuchen parallel.

D. *Dauerverkürzung*. Mit der durch Salyrgan erzeugten Kontraktur wurden die Wirkungen der schon genannten Substanzen verglichen: Monojodessigsäure ($1:2 \cdot 10^3 - 1:4 \cdot 10^3$), Jod in Form der LUGOLSchen Lösung¹ ($1:10^4 - 1:2 \cdot 10^4$), Maläinsäure ($1:10^3 - 1:5 \cdot 10^3$), Maläinsäureäthylimid ($1:10^3 - 1:2 \cdot 10^4$), Kupferglykokoll ($1:2 \cdot 10^3 - 1:5 \cdot 10^3$) und Oxarsan ($1:10^3 - 1:2 \cdot 10^3$). Die angeführten Dosen entsprachen in bezug auf Schnelligkeit des Anstieges und Maximum der Verkürzung etwa der Wirkung, die von einer Salyrganlösung $1:10^3 - 1:2 \cdot 10^3$ ausgelöst wurde. Ebenso wie der „Erste Anstieg“ erfolgte diese Kontraktur ohne ableitbare schnelle elektrische Vorgänge. Chronische Denervierung hatte keinen Einfluß auf den durch die SH-Gruppen-blockierenden Verbindungen verursachten „Zweiten Anstieg“.

Abkühlung des Zwerchfellpräparates auf 3°C verhinderte das Eintreten der Kontraktur nach Salyrgan usw. Beim Wiedererwärmen machte sich das Ansteigen des Tonus zwischen $8-10^\circ \text{C}$ bemerkbar.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Die Wirkungen des Salyrgan hatten wir in der ersten Mitteilung folgendermaßen beschrieben:

- A. Fibrillationen, die mit Aktionspotentialen einhergehen.
- B. Verlängerung der Erschlaffungsphasen elektrisch ausgelöster Kontraktionen.
- C. „Erster Tonusanstieg“, auf dessen Höhepunkt die elektrische Erregbarkeit erlosch.
- D. „Zweiter Tonusanstieg“, der eine Dauerverkürzung darstellt.

A. Wir schließen aus der Identität der durch Salyrgan und die Cholinesterase-Hemmstoffe ausgelösten Fibrillationen und deren Beeinflußbarkeit und der Hemmwirkung des Salyrgan gegenüber Cholinesterasen auf einen gleichen Wirkungsmechanismus von Salyrgan und den Anticholinesterasen. Unterstützt wird diese Annahme durch das Unvermögen der anderen SH-Gruppen-blockierenden Substanzen, die Cholinesterase zu hemmen und die Fibrillationen auszulösen. Wir bezeichnen daher die „erste“ Salyrganwirkung als *eserinartig*.

B. Die Verzögerung der Erschlaffung einer elektrisch ausgelösten Kontraktion kann als „Nachkontraktur“ aufgefaßt werden, wie sie von

¹ LUGOLSche Lösung: 1,0 J und 2,0 NaJ auf 100,0 Aqua destillata.

Veratrin, Dicarbonsäuren (FREY) oder Bleisalzen (CASH) ausgelöst werden kann. Der Veratrineffekt setzt eine intakte Endplatte voraus, denn seine elektrophysiologischen Grundlagen sind repetierende Entladungen (KUFFLER). Die vom Salyrgan in bezug auf die Erschlaffungsphase berichteten Befunde (Notwendigkeit der intakten Innervierung, Unbeeinflussbarkeit durch d-Tubocurarin und Decamethonium, Aufhebbarkeit durch Calciumionen, Verwandtschaft des Hg mit dem Blei) lassen es zu, diesen Salyrganeffekt als *veratrinartig* zu beschreiben.

C. Die Messung der Kaliumabgabe unter Salyrgan und den anderen thiolopriven Substanzen an Erythrocyten und am Muskel legt die Annahme nahe, daß der „erste Anstieg“ durch die Abnahme des Membranpotentials, das von der Höhe des Kaliumgradienten abhängig ist, verursacht wird. Neben Salyrgan zeigt noch Kupferglykokoll diese Wirkung.

Zur Aufrechterhaltung des Kaliumgradienten ist von der Zelle ein ständiger Transport von Kaliumionen gegen das Gefälle zu gewährleisten. Derselbe Mechanismus ist vom Nierentubulusepithel bekannt, denn auch hier muß u. a. das Kalium gegen das osmotische Gefälle aus dem Lumen in den Organismus zurücktransportiert werden. Ein Teil der diuretischen Wirkung des Salyrgan besteht nun in einer Erschwerung dieses Vorganges. Die Möglichkeit, daß der Hemmung des Kaliumrücktransportes in der Muskel- und der Nierenepithelzelle ein und derselbe Prozeß zugrunde liegt, mag angedeutet werden.

D. Neben Salyrgan lösen sämtliche SH-Gruppen-blockierende Verbindungen eine Dauerverkürzung aus, die „äußerlich“ nicht von der LUNDGAARD-Kontraktur geschieden werden kann. Ob es sich, wie im Falle der Monojodessigsäure, um eine Hemmung des Kohlehydratstoffwechsels durch Fermentblockade handelt, konnten wir mit den von uns verwendeten Methoden nicht entscheiden.

Die komplizierte Muskelwirkung des Salyrgans ist somit in Komponenten zerlegt, die eine mehr oder minder ausgeprägte Analogie zur Wirkung anderer Substanzen aufweisen. Als wahrscheinliche Angriffspunkte sind die Endplatte, die Zellmembranen und Muskelstoffwechsel zu nennen. Die von KUSCHINSKY u. TURBA; TURBA u. KUSCHINSKY; KOREY und PORTZEHL u. BRECHT beobachteten Wirkungen von Quecksilberverbindungen an Muskelproteinen sind von den hier beschriebenen verschieden. Eine Übertragung dieser Befunde, die an einfachen Systemen gewonnen wurden, auf eine vitale Einheit wie etwa eine Muskelzelle, ist deshalb nicht möglich, weil unter Bedingungen des Lebens *vor* den am contractilen Eiweiß möglichen chemischen Umsetzungen der Hg-Verbindungen eine ganze Reihe von *anderen* Reaktionen, die oben mitgeteilt wurden, schon stattgefunden und die Muskelzellen bereits zur Aufhebung ihrer Funktionen gebracht haben. Dies ist ein Beispiel dafür, wie vorsichtig man aus in vitro erhobenen Befunden Schlüsse auf das biologische Geschehen ziehen muß.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Symptomen der Salyrgan-Vergiftung ergibt die Möglichkeit, die von VOLINI, LEVITT u. MARTIN zuerst berichteten Fibrillationen der Skelet-Muskulatur durch Hemmung der Cholinesterase zu deuten. Das im Vordergrund stehende Symptom der akuten Vergiftung ist aber die Herzwirkung des Salyrgan, die eingehend untersucht ist (BARKER, LINDBERG u. THOMAS; CHASTAIN u. MACKIE; FARAH u. MOOK; DE GRAFF u. NADLER; JACKSON; LEHMAN; RUSKIN u. JOHNSON; WEXLER u. ELLIS; WOLFF u. SAGALL). Unsere Befunde stehen durchaus mit den am Säugetier- und Menschenherzen erhobenen im Einklang, machen es aber vor allem verständlich, daß den therapeutischen Versuchen, wie sie u. a. von JACKSON; DE GRAFF u. LEHMAN; RUSKIN u. JOHNSON; FARAH u. MOOK; JOHNSTON unternommen wurden, kein entscheidender Erfolg beschieden war, wenn von der Behandlung der Salyrganvergiftung mit Mercaptanen (vor allem Dithiopropanol — BAL) abgesehen wird (LONG u. FARAH; FARAH u. MOOK; RUSKIN u. JOHNSON; MOOK und JOHNSON).

Wenn wir auf die Frage nach dem Anschluß an biochemische Befunde und die klinische Toxikologie nur eine negative bzw. bedingt positive Auskunft geben können, so kann das dritte, von uns aufgeworfene Problem eindeutig beantwortet werden, denn die geschilderten Wirkungen des Salyrgan an der Skeletmuskulatur der Ratte kommen nicht allen SH-Gruppen-blockierenden Substanzen zu. Während die untersuchten thiolopriven Substanzen die LUNDSSGAARD-Kontraktur auslösen (LUNDSSGAARD; Zusammenfassung bei GODEAUX), verursacht lediglich noch Kupferglykokoll den „Ersten Anstieg“. Salyrgan nimmt also eine Sonderstellung ein.

Zusammenfassung.

Zur Erweiterung früher mitgeteilter Befunde über die Wirkung des 3-Oxymercuri-2-methoxy-propylamid des Salicylsäureglykolsäureäther — Salyrgan am Zwerchfell der Ratte werden weitere Versuche mit dieser quecksilberorganischen Substanz und anderen Verbindungen (Monojodessigsäure, elementares Jod, Maläinsäure, Maläinsäureäthylimid, Kupferglykokoll und 3-Amino-4-oxybenzol-1-arsenoxyd) durchgeführt, die die Salyrganwirkung charakterisieren und von der Wirkung anderer thiolopriver Stoffe abgrenzen sollen. Die komplexe Muskelwirkung des Salyrgan kann in folgende Komponenten zerlegt werden:

1. Der eserinartige Effekt, der die Fibrillationen verursacht,
2. die veratrinartige Wirkung, die als Verlängerung der Erschlaffungsphase einer elektrisch ausgelösten Kontraktion imponiert,
3. die Verminderung des Kaliumgradienten, die zur Kontraktur („Erster Anstieg“) und zum Erlöschen der elektrischen Erregbarkeit führt und
4. die Auslösung einer langsam einsetzenden, irreversiblen Kontraktur, die den Charakter der LUNDSSGAARD-Kontraktur aufweist.

Die genannten thiolopriven Substanzen rufen mit Ausnahme des Kupferglykokoll, das noch wie Salyrgan den Kaliumgradienten beeinflusst, lediglich die LUNDSSGAARD-Kontraktur hervor.

Wir danken Frl. G. BORCHERS für die verständnisvolle technische Mitarbeit. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sagen wir unseren Dank für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur.

- BARKER, M. H., H. A. LINDBERG u. M. E. THOMAS: J. Amer. med. Assoc. **119**, 1001 (1942). — BREH, F., u. O. H. GAEBLER: J. of Biol. Chem. **87**, 81 (1930); zit. nach K. LANG u. K. HINSBERG: Medizinische Chemie. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1938. — BÜLBRING, E.: Brit. J. Pharmacol. **1**, 38 (1946). — CASH, J. T.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol., Schmiedebergs Festschrift 1908, 93. — CHASTAIN, J. L., u. C. G. MACKIE: Sth. Med. Surg. J. **102**, 5 (1940). — FARAH, A., W. MOOK u. R. JOHNSON: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **76**, 403 (1951). — FARAH, A., u. W. MOOK: J. of Pharmacol. **102**, 125 (1951). — FREY, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **98**, 21 (1923). — GODEAUX, J.: J. de Physiologie **42**, 901 (1950). — DE GRAFF, A. C., u. R. A. LEHMAN: J. Amer. med. Assoc. **119**, 997 (1942). — DE GRAFF, A. C., u. J. G. NADLER: J. Amer. med. Assoc. **119**, 1006 (1942). — HOLTER, H.: C. r. Laboratoire Carlsberg **24**, 399 (1943). — JACKSON, D. E.: J. of Pharmacol. **29**, 471 (1926). — JOHNSTON, R. L.: J. Labor. a. clin. Med. **27**, 303 (1941). — KOREY, S.: Biochim. et Biophys. Acta **4**, 58 (1950). — KUFFLER, S. W.: J. Neurophysiol. **8**, 113 (1945); **9**, 367 (1946). — KUSCHINSKY, G., u. F. TURBA: Experientia (Basel) **6**, 103 (1950). — KUSCHINSKY, G., H. MERCKER, E. WESTERMANN u. H. LÜLLMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 401 (1953). — LEHMAN, R. A.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **64**, 428 (1947). — LINDERSTRÖM-LANG, K.: C. r. Laboratoire Carlsberg **24**, 333 (1943). — LONG, W. K., u. A. FARAH: J. of Pharmacol. **88**, 388 (1946). — LUNDSGAARD, E.: Biochem. Z. **217**, 162 (1930); **227**, 51 (1930); **230**, 10 (1930); **269**, 308 (1934). — PORTZEHL, H., u. K. BRECHT: Z. Naturforsch. **7b**, 1 (1952). — RUSKIN, A., u. L. F. JOHNSON: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **72**, 572, 577 (1949). — TURBA, F., u. G. KUSCHINSKY: Biochem. et Biophys. Acta **8**, 76 (1952). — VOLINI, J. F., R. O. LEVITT u. R. MARTIN: J. Amer. med. Assoc. **128**, 12 (1945). — WEXLER, J., u. L. B. ELLIS: Amer. Heart J. **27**, 86 (1944). — WOLFF, L., u. E. S. SAGALL: Arch. int. Med. **81**, 137 (1948).

Prof. Dr. G. KUSCHINSKY,
Mainz, Pharmakolog. Institut d. Johannes Gutenberg-Univ.

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. H. ELBEL).

Papierelektrophoretische Untersuchungen des Eiweißbildes von Leichenseren.

Von

FRANZ SCHLEYER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. November 1953.)

Es wurde geprüft, ob beim raschen oder gewaltsamen Tode Gesunder Veränderungen des Eiweiß-Spektrums entstehen, aus denen sich Hinweise auf die *Todesursache* gewinnen lassen (Todesfälle mit längerer Agone oder nach länger bestehender Krankheit haben hier naturgemäß auszuschneiden), ferner ob es in der Leiche zu kadaverösen Veränderungen des Pherogramms der Serumeiweiße kommt, und ob derartige Veränderungen regelmäßig und zeitabhängig sind, so daß sie in der gerichtlichen Medizin zur *Todeszeitbestimmung* verwertet werden können.

Methodik. Die Untersuchungen wurden mit dem „Elphor H“ nach GRASSMANN u. HANNIG ausgeführt. Serummenge jeweils 0,007 ml, Doppelstreifen (Whatman-Papier Nr. 1), Stromdurchfluß ± 14 Std. bei 120 V und 3,5 mA, Veronalnatrium-Puffer nach MICHAELIS (p_H 8,6). Nach beendeter Elektrophorese und Vortrocknung Trocknung der Streifen bei 100°, Färbung mit Amidoschwarz, Einbetten der Streifen in α -Bromnaphthalin-Paraffinöl, graphische Auswertung der Lichtextinktion (mit Verdoppelung der Ablesewerte), Zeichnung der GAUSSschen Kurven, Flächenausmessung durch zweimaliges Umfahren der Areale mit dem Planimeter, Berechnung der Prozentanteile der einzelnen Fraktionen in der üblichen Weise. Die Werte der beiden Streifen wurden gemittelt. Die Seren wurden vorher nicht gegen den Puffer dialysiert, dennoch waren alle Trennungen scharf und regelrecht.

I.

Zunächst wurde im Modellversuch das papierelektrophoretische Bild von *faulendem Serum in vitro* systematisch untersucht. Die bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse an konservierten Seren sind meist mit der Methodik nach TISELIUS oder ANTWEILER gewonnen und nicht einheitlich, bedurften daher einer Nachprüfung, gleichzeitig war der Einfluß einer starken Fäulnis auf das Serumeiweißbild als Vergleichsgrundlage für Studien an Leichenseren zu untersuchen.

Der *Literatur* waren folgende Angaben zu entnehmen: KREJCI u. Mitarb. stellten an 3 Jahre unter Zusatz von Glucose gelagerten Seren eine Zunahme des α -Arealen auf Kosten der β - und γ -Anteile fest (Methodik nach TISELIUS). LANG u. Mitarb. fanden nach 6 Jahren Lagerung bei Zimmertemperatur ohne Zusätze Werte

im Rahmen der Norm (Methodik TISELIUS). WATERSTRADT sah, in der Geschwindigkeit der Veränderung abhängig von der Aufbewahrungstemperatur, eine zunehmende Erniedrigung der α -Zacke und Verkleinerung der β - bei relativer Zunahme der γ -Globulinfraction, schließlich verringerte sich auch die γ -Globulinfraction (Bestimmung nach ANTWEILER), der Gesamteiweißgehalt blieb gleich. — Neuerdings beschrieben GRUNDMANN u. FISCHER in steril aufbewahrten Vollblutkonserven eine mehr oder weniger graduelle, allerdings nicht obligate Vermehrung aller Plasma-Globulinanteile (am stärksten der β - und γ -Fraktion) innerhalb von 22 Tagen auf Kosten des Albumins, dagegen entstand im sterilen Reinplasma keine Veränderung des Pherogramms innerhalb von 4 Wochen (Methodik nach GRASSMANN u. HANNIG). Aufschütteln des corpusculären Bodensatzes der Konserven vor Abnahme des Plasmas der Vollblutkonserve ergab regelmäßige geringe Zunahme des Globulinanteils (Wirkung der Beimischung von Hämoglobin, s. u.); die Hämolyse wird auf die allmähliche Glykolyse des Blutzuckers zurückgeführt. — Die Ergebnisse von MOORE u. Mitarb. an zum Teil sehr eingreifend behandelten Serumproben sind in diesem Zusammenhang nicht zu verwerten.

In der *eigenen Untersuchung* wurde frisches Serum eines Gesunden in 3 Teile geteilt und in verkorkten Röhrchen bei 4°, 20° und 37° ohne besondere Schutzmaßnahmen der Fäulnis überlassen. Die Beobachtung am 37°-Serum dauerte 2½ Monate, die am 4°- und 20°-Serum 7 Wochen an. Es wurden 11 (4°), 10 (20°) und 12 (37°) Messungen (Doppelstreifen) vorgenommen, anfänglich alle 3—5 Tage, später in Abständen bis zu 2 Wochen. Der sich allmählich bildende trübe Bodensatz der faulenden Serumproben wurde vor der Entnahme zur Messung jeweils aufgeschüttelt.

Ergebnisse. Der Anteil der Globulinfractionen war am Ende der Messungen in der bei Brutschranktemperatur aufbewahrten Serumprobe erheblich gesunken, die Albuminfraction dementsprechend vermehrt. Bei Alterung bei Zimmertemperatur traten nur geringfügige Veränderungen im gleichen Sinne ein, im Kühlschrank kam es überhaupt nicht zu einer Erniedrigung der Globulin-Prozentwerte. Von der 6. Woche bei 4° und der 5. bei 20° an prägten sich die α_1 - und α_2 -Zacke nicht mehr getrennt aus, bei 37° schwand die α_1 -Zacke schon innerhalb der ersten Tage. Die gleiche Verschmelzung trat bei 20° und 37° für das β - und γ -Areal in der 6. Woche ein; die Fraktionen mußten nach diesen Zeitpunkten als Summenwerte ausgemessen werden. Tab. 1 zeigt die *Endwerte* im Ver-

Tabelle 1. Prozentanteile der Eiweißfraktionen bei Serumfäulnis.

	Normalwerte der Methodik	Frischserum	4° (nach 7 Wochen)	20° (nach 7 Wochen)	37° (n. 10 Wochen)
Albumin	61,3	61,0	59,1	66,6	75,8
Globuline α_1	4,1	5,0	} 12,2	} 10,0	} 7,7
α_2	8,1	7,0			
β	11,0	10,0	13,0	} 23,6	} 16,4
γ	15,5	16,6	16,7		

gleich zu den Grundwerten (Mittelwerte aus 10 Auswertungen des Streifenpaars des Frischserums), kleine Fluktuationen der Werte bei den Zwischenmessungen lagen innerhalb der üblichen Variationsbreite der Methodik.

Bei fast allen Pherogrammen, auch der noch wenig gealterten Serumproben, ging die γ -Globulinkurve (ascending boundaries) nicht von der Nullinie der Messung aus, sondern blieb um eine geringe Distanz (bis maximal etwa 10 mm unserer graphischen Darstellung) gehoben, d. h. es bestand eine geringfügige angefärbte „Verschmierung“ des aufgetragenen Serums, ehe die eigentliche Trennung begann. Eine mangelhafte Durchtränkung der Streifen mit der Transparenzlösung oder Inkonzanz des Photozellenstroms als Ursache dieser anfänglichen Nullpunktschwankung wurde ausgeschlossen, jedoch kann auch Trübung des Serums (wie bei unseren Versuchen) oder Aufrauhung des Papiers an der Auftragstelle mit der Pipette diese Erscheinung hervorrufen (mündliche Mitteilung von HANNIG). Wir haben die Fußpunkte der GAUSSschen Kurven einheitlich auf die Nullinie des Papiers durchgezogen, die dadurch bedingte Vergrößerung der Fläche betrifft nur das γ - und allenfalls das β -Globulin, fällt aber an Umfang nicht ins Gewicht.

Besprechung. Erst bei sehr intensiver Serumfäulnis in der Wärme findet eine nennenswerte Schädigung der Globuline mit relativer Zunahme des Albumins statt. Der Schwund einer isolierbaren α_1 - bzw. der β -Fraktion war auch im 20° Serum charakteristischer als die Verschiebung der Prozentzahlen der Fraktionsanteile. Die Befunde entsprechen im

Prinzip denen von WATERSTRADT und den Ergebnissen von GRUNDMANN u. FISCHER an reinem Plasma.

II.

Elektrophoretisch untersucht wurden 15 *Leichenserum*. Das Blut wurde aus der Oberschenkelblutader, bei Sektionen zum Teil aus der unteren Hohlblutader entnommen, soweit es nicht ganz hämolytisch oder in eine dicke Schmiere verwandelt war. Mäßige Hämolyse wurde in Kauf genommen, wenn sich noch Serum abtrennen ließ.

Alle Einzelheiten sind aus Tab. 2 sowie Abb. 1—3 zu entnehmen. Es wurde versucht, die Fälle nach der Dauer des Todesablaufs zu gliedern, dabei ließ sich allerdings nur ein ganz plötzlicher von einem Tod mit mehr oder weniger langer Agone sicher trennen.

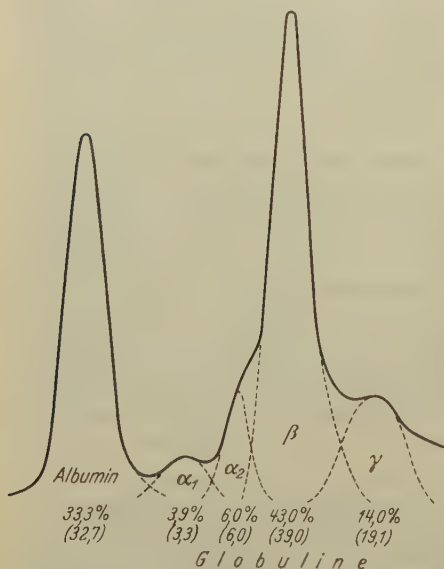


Abb. 1. Fall 14, Säugling von 6 Monaten, unerwarteter Tod (Obduktion ohne Klärung, serologisch im Tierversuch auf Toxoplasmose verdächtig). Blutentnahme 72 Std p. m. (V. cava inf.), hämolytisches Serum. Pherogramm eines Streifens (in Klammern die Prozentwerte des 2. Streifens).

Besprechung. Die Ergebnisse sind keineswegs einheitlich oder streng abhängig von der Todeszeit, es fallen aber sofort die niedrigen, immer unter der Norm liegenden und zum Teil bis auf die Hälfte verminderten

Albuminwerte und die der Albuminverringerung korrelative Zunahme insbesondere der gröberdispersen Globuline als allgemeine Tendenz auf. Besonders charakteristisch sind Fall 13 und 14 (Abb. 1).

Die Vermutung, daß es sich bei dieser „Linksverschiebung“ um eine *allgemeine Leichenerscheinung* handelt, wird durch die Ergebnisse bei *mehrfacher* Blutentnahme mit Serumelektrophorese bei *derselben* Leiche zur Gewißheit (Fall 4, 8, 11; Abb. 2 und 3): die Verminderung der Albumin- und die Zunahme im wesentlichen der β - und γ -Globulinfraktion verläuft *progradient*, somit entspricht das als „charakteristisch“ bezeichnete Bild nur dem *fortgeschrittenen* Stadium der Veränderungen. Damit entfällt jegliche Möglichkeit einer Zurückführung der pherographischen Befunde auf die Todesursache; in Hinsicht auf die *Todeszeit* gibt der Befund keine Hinweise, die der üblichen Diagnostik auf Grund der Bewertung der äußeren Leichenerscheinungen überlegen wären.

Zu erklären ist das Phänomen der relativen Globulinvermehrung im Leichenserum nicht mit der Eiweißfäulnis als solcher, denn wenigstens die Serumfäulnis *in vitro* hat, wie oben gezeigt wurde, das entgegengesetzte Ergebnis (Abnahme der Globuline). Es

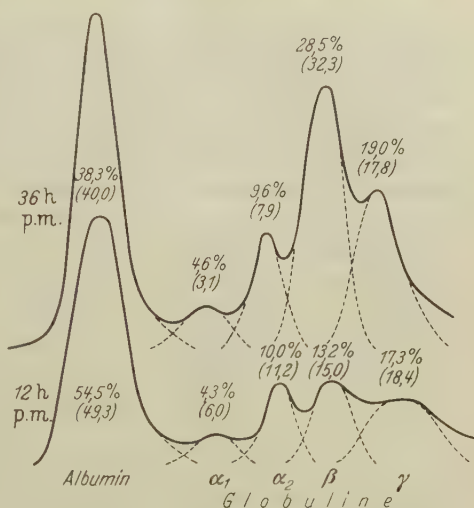


Abb. 2. Fall 8, 24-jähr. Frau, Tod 20 min nach Schädelbruch. 1. Blutentnahme 12 Std, 2. Entnahme 36 Std p. m. (V. femoralis). Pherogramm je eines Streifens (in Klammern die Prozentzahlen des 2. Streifens).

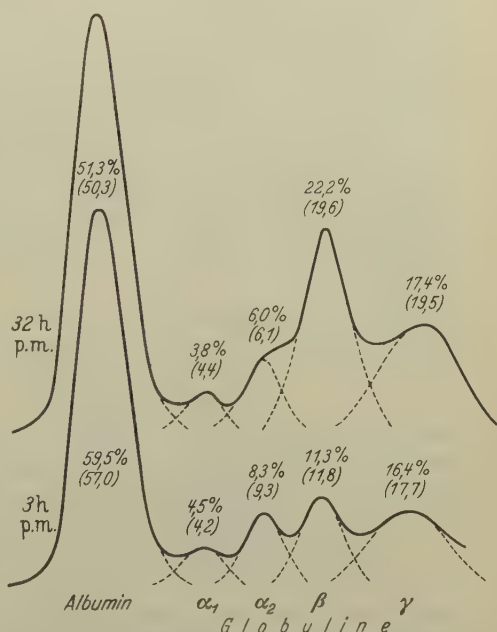


Abb. 3. Fall 11, 68-jähr. Mann, Tod durch CO-Vergiftung. 1. Blutentnahme 3 Std, 2. Entnahme 32 Std p. m. (V. femoralis). Pherogramm je eines Streifens (in Klammern die Prozentwerte des 2. Streifens).

Tabelle 2. *Ergebnisse der Papierelektrophorese von 15 Leichenseren* (Methodik nach GRASSMANN u. HANNIG). Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. In Klammern die Normalwerte der Serumeiweißfraktionen bei der gleichen Methodik.

Nr.	Alter usw.	Todesursache	Überlebens- dauer (bzw. Agone)	Blut- entnahme p. m.	Serumeiweißfraktionen in %				
					Alb. (61,3)	α_1 (4,1)	α_2 (8,1)	β (11,0)	γ (15,5)
Schneller Tod									
1	21j. ♂	Erschießen (Herzzer- reißung)	—	24 Std	44,6	14,2		18,8	24,5
2	Junger ♂	Schädelzer- trümmerung	—	2 Tage	49,5	5,3	6,7	15,1	23,0
3	80j. ♂	Sturz (keine Obd.)	—	einige Std	51,7	4,8	11,5	11,5	20,0
4	51j. ♂	Akutes Herz- versagen (Schwielen- herz)	—	8 Std 32 Std 56 Std	53,1 51,0 47,3	4,9 4,3 5,6	9,4 10,8 11,4	12,5 12,8 14,1	20,0 22,3 21,4
5	45j. ♂	Geplatztes Hirnbasis- aneurysma	—	36 Std	45,7	5,1	14,9	12,1	22,0
6	Ältere ♀	? plötzl. Tod (keine Obd.)	—	3 Std	47,4	6,8	8,6	12,5	23,7
Längere Agone (vgl. auch 8, Abb. 2, und 11, Abb. 3).									
7	45j. ♂	Ertrinken		2 Tage	43,8	6,4	10,0	15,6	21,4
9	Älterer ♂	Wirbelbruch	höchstens 1 Std	36 Std	42,1	4,4	10,4	13,4	29,8
10	40j. ♂	CO-Vergif- tung	?	3 Tage	48,1	4,4	9,5	18,8	19,1
12	54j. ♂	Akuter Kreislauftod	2 Std	18 Std	54,7	7,0	9,5	12,7	16,0
13	Junger ♂	Plötzl. Tod bei eitriger Tonsillitis (Sepsis)	höchstens einige Std	2 Tage	30,0	3,5	8,0	58,5	
Längere Krankheit (vgl. auch 14, Abb. 1).									
15	7j. ♂	Epidurales Hämatom	einige Tage	3 Tage	46,8	6,1	14,7	13,9	17,5

handelt sich wohl auch nicht um eine echte Verminderung, Denaturierung oder schlechtere Darstellbarkeit der *Albumine*, sondern um eine *absolute* Zunahme der Globuline, insbesondere ihres β -Anteils, wie man aus dem teilweise geradezu riesigen Anwachsen der entsprechenden Kurventeile

schließen muß. Die am nächsten liegende Erklärung ist vielmehr in einem Effekt durch intravasale *Hämolyse* im Leichenblut zu suchen: MOORE u. Mitarb. beschrieben eine mit der Zugabe von Hämoglobin zu Serum quantitativ genau übereinstimmende Zunahme des γ -Globulin-Areals (bei Verdünnung des Serums mit Phosphatpuffer) und analoge Vergrößerung des β -Areals bei Verdünnung in Barbituratpuffer (TISELIUS). Auch GRUNDMANN u. FISCHER fanden ja bei Hämolyse geringe Zunahme des Plasmaglobulinanteils. In der Tat war gerade das Serum unserer Fälle 13 und 14 besonders hämolytisch. Dennoch möchten wir das Phänomen nicht ausschließlich der Hämoglobinbeimischung zuschreiben, zumal auch MOORE keine entsprechende Verkleinerung des Albuminanteils angibt, sondern zusätzlich eine grobe kadaveröse Störung des *Gleichgewichts* der Serumeiweiße annimmt.

Zusammenfassung.

1. Erst bei sehr intensiver Fäulnis von Serum in vitro flachen die Globulinanteile der papierelektropherographischen Kurve sich ab, dabei prägt sich allmählich die α_1 - und dann auch die β -Zacke nicht mehr gesondert aus.

2. Im Serum der Leiche kommt es anscheinend regelmäßig zu einer fortschreitenden „Vermehrung“ insbesondere der gröberdispersen Globulinfractionen zuungunsten der feindispersen Anteile des Eiweiß-Spektrums, die zum Teil einer Beimischung von Hämoglobin zum Serum infolge der kadaverösen Hämolyse zuzuschreiben ist, aber in der Schnelligkeit der Entwicklung nicht an bestimmte Zeiten gebunden ist.

3. Aus den unter 2 genannten Gründen ist das Elektropherogramm des Leichenserums für die Diagnostik der Todesursache nicht, für die Todeszeitbestimmung höchstens im Rahmen der übrigen Leichenerscheinungen zu verwerten.

Herrn Dipl.-Physiker K. SELLIER, Volontärassistent am Institut, habe ich für mannigfache technische Hinweise und Hilfen zu danken.

Literatur.

GRASSMANN, W., u. K. HANNIG: Z. physiol. Chem. **290**, 1 (1953). — GRUNDMANN, G., u. R. FISCHER: Bluttransfusion **2**, 18 (1953). (Beih. zur Dtsch. med. Wschr. **78**, 1953.) — KREJCI, L., u. a.: J. of Biol. Chem. **158**, 693 (1945) (zit. bei LANG). — LANG, K., u. a.: Klin. Wschr. **29**, 217 (1951). — MOORE, D., u. a.: J. of Biol. Chem. **180**, 1147 (1949). — WATERSTRADT, K.: Ärztl. Forsch. **6**, 181 (1952).

Privatdozent Dr. F. SCHLEYER, Bonn, Wilhelmsplatz 7.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für Medizinische Forschung
und Fortbildung der Justus Liebig-Hochschule Gießen
(Direktor: Prof. Dr. F. HILDEBRANDT).

Beitrag zur Frage einer quantitativen Durchströmungs- messung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. REIN.

Von
J. DÖRNER.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. November 1953.)

Wie früher in Aussicht gestellt, berichten wir zur Frage einer quantitativen Durchströmungsmessung mit der Thermostromuhrmethode nach REIN auf Grund eigener in mehr als 300 Modelleichungen gewonnener Erfahrungen. Ausgangspunkt dieser umfangreichen Eichversuche war das Problem, inwieweit es erlaubt ist, aus den im Modellversuch gewonnenen Eichdaten Rückschlüsse quantitativer Art auf die Durchblutung in vivo zu ziehen.

REIN nimmt in positivem Sinne dazu Stellung, aber mit der Einschränkung, daß man „dabei unter Umständen mit einem Fehler rechnen muß, welcher z. B. für Fragen der Kreislaufregulation . . . belanglos ist, hingegen für solche des Stoffwechsels die gestellte Forschungsaufgabe vielleicht unmöglich macht“. CERLETTI u. ROTHLIN glauben, daß „nur die Eichkontrolle an den jeweils untersuchten Gefäßen selbst genügende Sicherheit bietet“. WICK gibt an, „daß es nicht möglich erscheint, für ein Thermoelement allein eine stets gültige Charakteristik aufzustellen“, während nach demselben Autor eine blutige Schlußzeichnung durchaus reproduzierbare Durchflußwerte ergeben soll. SCHMIDT u. BOGUTH fordern, den mittleren Fehler der einzelnen Messungen zu erfassen und ihn bei Angabe quantitativer Ergebnisse zu berücksichtigen. Neuerdings wird von ENGELHORN, GÖRTTLER, GRUPP u. JANSSEN die Möglichkeit einer quantitativen Messung mit der REINSchen Stromuhr verneint.

Bei Prüfung der Möglichkeit einer quantitativen Durchströmungsmessung (im Jahre 1951) gingen wir von der Bedingung aus, daß die mit demselben Element an verschiedenen Tagen und jeweils anderen Venen mit unterschiedlicher Heizintensität ermittelten Eichkurven quantitativ übereinstimmen müssen. Ist dies der Fall, dann ist die wichtigste Voraussetzung für die Übertragung der in vitro gewonnenen Ergebnisse auf die Versuche in vivo erfüllt, besonders da REIN zeigen konnte, daß Änderungen der Bluttemperatur und Viscosität des Blutes die Eichkurve nicht zu beeinflussen vermögen.

Methodik.

Als Diathermie-Thermostromuhr kam ein Gerät der Firma Hellige zur Verwendung, das, durch Kriegseinwirkung beschädigt, nach den Angaben REINS neu verschaltet wurde (3 Sendekreise, Frequenz 240 000 Hz, vollnetzbetrieben, Stromstärkemessung mit einem Hitzdrahtamperemeter der Firma Hartmann und Braun). Messung des Gefäßwiderstandes mit einem Stöpselrheostaten der Firma Ruhstrat unter Berücksichtigung der wechselstrombedingten Widerstandsänderungen.

Registrierung der Thermoströme erfolgte mit schnellschwingenden Ruhstrat-Galvanometern. Alle Eichungen eines Elementes, soweit sie in dieser Arbeit ausgewertet wurden, sind mit demselben Galvanometer registriert worden.

Insgesamt wurden 47 Thermoelemente von 1—5,5 mm Durchmesser in 336 Eichungen, von denen 100 in Zusammenarbeit mit KUSCHKE und WESTERMANN vorgenommen wurden, geprüft. Zur Verwendung kamen 15 Elemente alten Typs (Typ A), 16 Elemente neuen Typs (Typ N), 9 Elemente eines modifizierten Typs (Typ M) und 7 Elemente zur blutigen Durchströmungsmessung. Die Modifikation bei den Elementen vom Typ M besteht darin, daß Heizelektroden und Thermolötstellen wie bei den Elementen vom Typ A getrennt, die Thermolötstellen aber am Boden der Elementrinne luftisoliert angebracht sind. Die Elemente sind teilweise im REINSchen Institut, teilweise im KERCKHOFF-Institut in Bad Nauheim hergestellt worden.

Die Eichanordnung stimmte streng mit der von REIN benutzten überein, die Verf. während mehrerer Monate als Gast des Göttinger Institutes kennen lernen durfte. Als Durchströmungsflüssigkeit verwendeten wir 0,9%ige Kochsalzlösung und defibriniertes Rinderblut bei Zimmertemperatur. Die für die Eichung notwendigen Venen wurden für die kleineren Elemente aus den Venae jugulares von Versuchshunden excidiert, für die größeren Elemente dienten Mesenterialvenen von Rindern. Das Durchflußvolumen wurde mit Hilfe von Rotametern gemessen. Durchströmungsänderungen erfolgten bei den kleineren Elementen von etwa 8,5 cm bis zu 285 cm³/min, soweit die Größe des Elementes eine solche Zunahme zuließ, bei den größeren Elementen fanden Steigerungen bis zu 650 cm³/min statt. Es wurden damit bei jeder Eichung Stromvolumenänderungen herbeigeführt, wie sie in physiologischen oder pharmakologischen Versuchen nur selten überschritten werden dürften. Bei jeder Eichung wurden im Durchschnitt 10—12 Werte ermittelt, die zur Hälfte bei zunehmendem und zur Hälfte bei abnehmendem Durchfluß registriert wurden.

Es wurde darauf geachtet, daß das Galvanometer auf Strömungsänderungen hin, wie sie auch bei der Eichung herbeigeführt wurden, ohne Aufheizung mit dem hochfrequenten Wechselstrom keine Ausschläge gab. Unter Umständen mußte aus diesem Grunde mit dem Beginn der Eichung lange gewartet werden. Manche Elemente (meist vom Typ A) ergaben aber trotz längsten Wartens bei Durchflußänderungen von niederen bis zu hohen Werten eine Veränderung der Nulllinie von einigen mm, die sich bei späteren Eichungen fast in derselben Weise immer wiederholte. REIN hat darauf schon ausführlich hingewiesen. Wir sind dann so vorgegangen, daß wir die Nulllinie bei mittleren Durchströmungswerten geschrieben haben.

Die Exponenten x in der $G \cdot V^x$ -Formel wurden für jedes Element aus den auf bilogarithmisches Papier übertragenen Eichkurven empirisch ermittelt.

Von den insgesamt 366 Eichungen sind die ersten 120 bei der Auswertung nicht berücksichtigt worden, da während dieser Zeit geringfügige Änderungen an der Stromuhr und dem Registriersystem vorgenommen wurden und sie außerdem dazu dienten, durch genügend große eigene Erfahrungen eine fehlerfreie Handhabung der Methode zu gewährleisten.

Ergebnisse.

1. Elemente vom neuen Typ (Typ N).

Die Eichungen der 16 Elemente vom Typ N ergaben folgendes:

a) Mit keinem der 16 Elemente ließen sich bei mindestens dreimaliger Eichung in einer Richtung quantitativ übereinstimmende Eichkurven reproduzieren, d. h. die Amplituden gleicher Strömungswerte verhielten sich nicht wie die Quadrate der Heizstromstärken ($G_1 : G_2 \neq I_1^2 : I_2^2$). Als noch erlaubte Fehlergrenze legten wir eine Abweichung von $\pm 20\%$ zu Grunde.

b) Eignet sich somit nach a) keines unserer 16 Elemente vom Typ N zu einer absoluten Durchströmungsmessung, so war ihre Brauchbarkeit zur Gewinnung relativer Durchströmungswerte zu prüfen. Hierbei ist es nicht notwendig, daß die Eichkurven bei einer Umrechnung wie unter a) sich decken, sondern lediglich, daß ihre Exponenten x in der $G \cdot V^x$ -Formel (im folgenden kurz als Exponenten bezeichnet) gleich sind, d. h. die auf doppelt logarithmisches Papier übertragenen Eichkurven eines Elementes müssen dieselbe Steilheit haben. Unter den 16 Elementen befinden sich vier ($= 25\%$), bei denen der Exponent bei mehr als dreimaliger Eichung mit Kochsalzlösung oder Blut stets gleich blieb. Als Fehlergrenze sahen wir dabei eine Abweichung des Exponenten von $\pm 0,04$ an, die bei Errechnung der relativen Durchströmungsänderungen zu Fehlern bis zu 20% führt, sofern die Gefäßreaktionen ein gewisses Ausmaß nicht überschreiten.

c) Von den übrigen 12 Elementen, die zu keiner irgendwie vergleichbaren Durchströmungsmessung zu gebrauchen sind, da ihr Exponent von Eichung zu Eichung ein anderer sein kann, sind sieben ($\approx 44\%$) in den Fällen verwendbar, in denen es lediglich auf eine Bewertung der Ausschlagsrichtung bzw. Richtung der Durchblutungsänderung ankommt. Wenn die Exponentengröße bei diesen Elementen auch schwankt, so ist die Streuung doch meist nicht größer als 0,2, und der Kurvenverlauf läßt darauf schließen, daß die Ausschlagsgröße in einer vernünftigen Beziehung zur Durchströmungsänderung steht. Daneben ist für die Frage, ob Elemente mit wechselnder Exponentengröße zu obigem Zweck zu gebrauchen sind, mit von Bedeutung, wie sich die Elemente hinsichtlich anderer Eigenschaften wie Nulllinienabweichung, Nulllinienkonstanz, Streuung der bei einer Eichung erhaltenen einzelnen Werte, Zuverlässigkeit und Güte des Elementes bei Eichung in anderer Stromrichtung verhalten. Die Beurteilung solcher Elemente wird damit weitgehend zu einer Erfahrungssache, die nicht schematisch gehandhabt werden kann.

d) Die restlichen 5 Elemente ($\approx 31\%$) erwiesen sich als vollkommen unzulänglich. Neben der von Eichung zu Eichung in starkem Maße sich ändernden Charakteristik des Elementes war für diese Elemente beson-

ders kennzeichnend, daß eine Eichkurve nur beim Anlegen des Elementes in der einen Richtung zu erhalten war, während in der anderen Stromrichtung überhaupt keine vernünftige Beziehung zur Durchströmungsänderung ermittelt werden konnte.

e) Die Exponenten der Elemente vom Typ N sind fast alle nicht größer als 0,4, meistens liegen sie um 0,3. Die Einstellzeit ist im Durchschnitt relativ kurz, doch schwankt sie von Element zu Element. Der Temperatúrausgleich ist meist schnell erreicht.

f) Nach den Angaben REINS bestehen zwischen Ringer- und Bluteichungen keine Unterschiede. Wir können dies für einen Teil der Elemente bestätigen, teilweise weicht jedoch der Kurvenverlauf bei Eichung mit Kochsalzlösung von dem Verlauf der Eichkurve bei Verwendung von defibriniertem Rinderblut ab. Da diese Unterschiede bei den Elementen vom Typ A deutlicher in Erscheinung traten, sollen sie dort besprochen werden.

2. Elemente vom alten Typ (Typ A).

a) Die Elemente vom Typ A lieferten in ihrer Gesamtheit konstantere Ergebnisse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Eichkurven als die Elemente vom Typ N. Trotzdem fiel es auch hier schwer, Elemente ausfindig zu machen, die bei wiederholten Eichungen die Bedingung erfüllten, daß sich $G_1 : G_2 = I_1^2 : I_2^2$ verhält. Unter den 15 von uns geeichten Elementen vom Typ A befanden sich zwei, die der Forderung nach quantitativ übereinstimmenden Eichkurven in etwa genügten. Wir geben in Abb. 1 die auf doppelt logarithmisches Papier übertragenen Eichkurven unseres besten Elementes wieder. Man ersieht daraus, daß die Bluteichungen (Eichungen Nr. 207, 228 und 252) einen fast übereinstimmenden Exponenten ergaben. Die ermittelten Werte für die Galvanometerausschläge weisen keine große Abweichung von der durch sie gelegten Geraden auf. Die Eichungen mit Kochsalzlösung (Eichungen Nr. 183, 188 und 197) stimmen hinsichtlich der Exponentengröße weitgehend mit den Bluteichungen überein; infolge der gegenüber Blut verschiedenen Viskosität der Kochsalzlösung ändert sich hier die Charakteristik des Elementes bei höheren Durchströmungswerten.

Um zu prüfen, ob das Element die Beziehung $G_1 : G_2 = I_1^2 : I_2^2$ erfüllt, haben wir die Strömungswertamplituden der Eichungen Nr. 183, 188, 197, 207 und 252 nach vorstehender Gleichung auf die Werte der Eichung Nr. 228 umgerechnet und die dabei erhaltenen Werte in der Abb. 2 wiedergegeben. Die Abweichung der einzelnen Punkte von der durch sie gelegten Geraden scheint auf den ersten Blick relativ groß, doch handelt es sich dabei im wesentlichen um die bei den Eichungen mit Kochsalzlösung erhaltenen Werte. Die Streuung der Bluteichwerte beträgt bis zu einer Durchströmungsgröße von $300 \text{ cm}^3/\text{min}$, die für dieses Element von

4,5 mm Durchmesser durchaus normal ist, fast $\pm 20\%$. Im höheren Durchströmungsbereich ist die Abweichung etwas größer. Bei unserem zweitbesten oben erwähnten Element, dessen Eichkurven hier nicht wiedergegeben sind, liegen die Verhältnisse etwas ungünstiger: hier

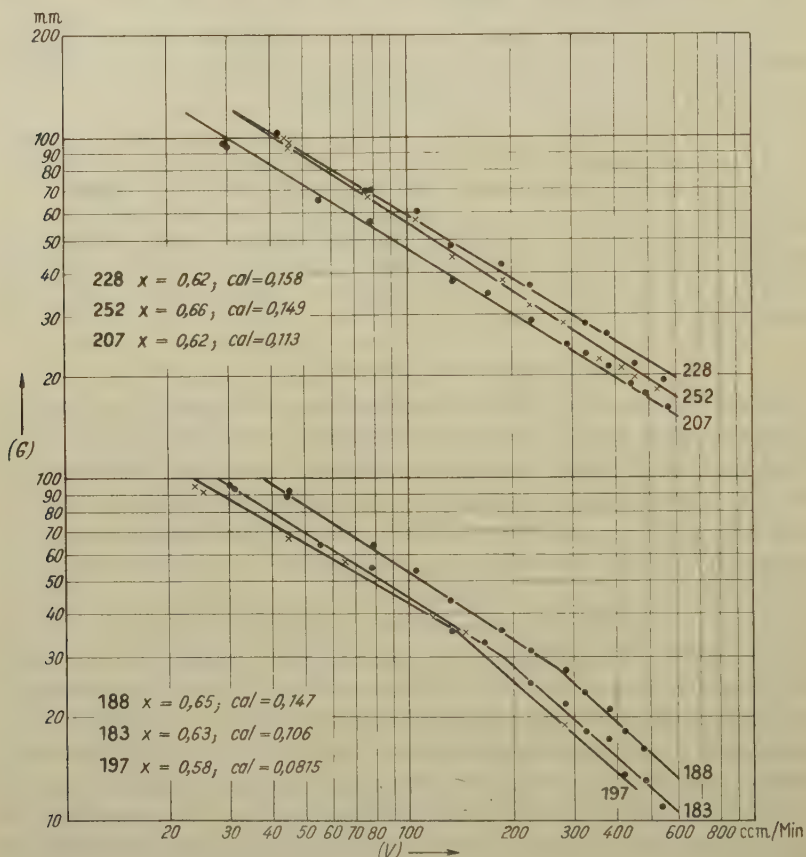


Abb. 1. Auf bilogarithmisches Papier übertragene Eichkurven eines Elementes vom Typ A mit einem Durchmesser von 4,5 mm. Die Eichungen Nr. 207, 228 und 252 wurden mit defibriniertem Rinderblut, die Eichungen Nr. 183, 188 und 197 mit 0,9% iger Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur ausgeführt. $\times$ bedeutet die Größe des Exponenten in der Beziehung $G \cdot V^x = \text{konst.}$ Einzelheiten siehe Text.

kommen auch bei den Bluteichungen Abweichungen bis zu 28% von dem Mittelwert vor. Dieses Ergebnis zeigt, daß unter Berücksichtigung einer Fehlerbreite von $\pm 20\%$ höchstens ein Element von den von uns geprüften 15 Elementen vom Typ A die Voraussetzungen für eine absolute Durchströmungsmessung besitzt, während bei Einräumung einer etwas größeren Fehlerbreite eventuell zwei Elemente geeignet sind.

Zur Frage, ob man sich auf die Genauigkeit der Angaben eines solchen Elementes bei in vivo-Versuchen verlassen kann, möchten wir folgendes an einem anderen Element gewonnenes Ergebnis anführen. Das Element wurde zunächst fünfmal in einer Stromrichtung geeicht, dreimal mit Kochsalzlösung und zweimal mit Blut. Alle Werte stimmten in fast idealer Weise überein. Um zu prüfen, ob das Element sich zu einer absoluten Durchströmungsmessung eignet, wurden noch zwei weitere Blut-eichungen durchgeführt mit dem Ergebnis, daß nun nicht nur die neuen

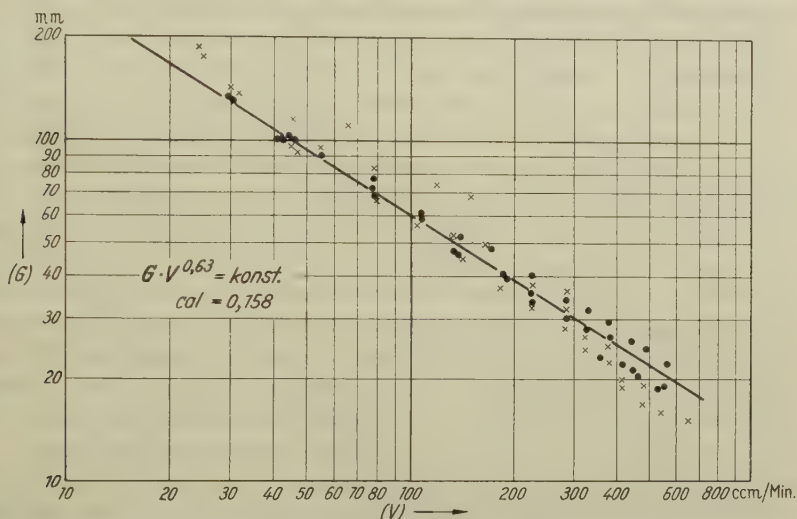


Abb. 2. Umrechnung der Strömungswertamplituden der Eichungen Nr. 183, 188, 197, 207 und 252 von Abb. 1 nach $G_1 : G_2 = I_1 : I_2$ auf die Werte der Eichung Nr. 228. × Eichungen mit Kochsalzlösung (Nr. 183, 188, 197), • Eichungen mit Blut (Nr. 207, 228, 252). Siehe Text.

Werte keine quantitative Beziehung zu den schon früher ermittelten mehr aufwiesen, sondern auch die Charakteristik des Elementes eine ganz andere war. Dieses Beispiel zeigt unseres Erachtens, daß man hinsichtlich Folgerungen quantitativer Art, zu denen ein solches Element bei in vivo-Versuchen verleitet hätte, wären nicht noch ein oder zwei weitere Eichungen gemacht worden, äußerst zurückhaltend sein muß.

b) Von den übrigen 13 Elementen vom Typ A eignen sich sechs (= 40%) zur prozentualen Durchströmungsmessung, da ihre Charakteristik bei wiederholten Eichungen gleich blieb (vgl. unter 1 b).

c) Weitere sechs Elemente (= 40%) sind zu einer Durchströmungsmessung zu gebrauchen, bei der es nicht auf absolute Werte oder prozentuale Veränderungen ankommt (entsprechend 1 c).

d) Unter den 15 Elementen fand sich ein Element ($\approx 7\%$), das in beiden Stromrichtungen keine vernünftigen Werte ergab und deshalb ausgesondert werden mußte.

e) Die Exponenten der Elemente vom Typ A sind im Durchschnitt, wie bekannt, wesentlich größer als diejenigen der neuen Typen. Sie liegen meist zwischen 0,5 und 0,6. Die Einstellzeit ist im allgemeinen länger und der Temperatúrausgleich nicht so schnell erreicht, öfters bleibt auch eine nicht zu beseitigende Nulllinienabweichung von einigen mm bestehen; doch haben wir auch hier unter den alten Typen Elemente gefunden, die in dieser Beziehung besser sind als das eine oder andere Element vom neuen Typ.

f) Die Eichungen mit Blut und Kochsalzlösung stimmen teilweise überein. Doch beobachtet man auch in diesen Fällen nicht selten, daß bei Verwendung von physiologischer NaCl-Lösung die erhaltenen Werte stärker streuen, wie dies aus der Abb. 2 zu entnehmen ist. Mitunter ist auch die Charakteristik eines Elementes bei Eichung mit Kochsalzlösung gegenüber den Bluteichungen in konstanter Weise verändert, oder der Exponent eines Elementes ist bei Verwendung von Blut gleichbleibend, während er bei Verwendung von NaCl-Lösung in seiner Größe schwanken kann. Darüber hinaus aber zeigen sich öfters besonders bei den größeren Elementen charakteristische Unterschiede zwischen den beiden Eichflüssigkeiten, insofern von bestimmten für das Element durchaus nicht anormalen Durchflußwerten an die Charakteristik des Elementes sich bei Benutzung von Kochsalzlösung plötzlich ändert, so daß die Eichkurve bei bilogarithmischer Darstellung mehr oder weniger steil abfällt (Abb. 1). Bei kleineren Elementen kann diese Funktionsänderung ebenfalls vorkommen, doch ist sie hier seltener. Bei Verwendung von Blut tritt eine solche Störung gelegentlich in Erscheinung, läßt sich aber nicht wie bei Verwendung von NaCl-Lösung reproduzieren. CERLETTI u. ROTHLIN haben auf diese Änderung der Eichkurve aufmerksam gemacht und deren Ursache diskutiert. Ebenfalls bestätigen können wir die Angaben von CERLETTI u. ROTHLIN, daß bei Verwendung von physiologischer NaCl-Lösung mitunter die Eichkurven, auf bilogarithmisches Papier übertragen, keine Geraden ergeben, sondern in bogenförmigem Verlauf steil zum Nullwert abfallen. Die Beziehung zwischen G und V ist in diesen Fällen verändert. Zur Erklärung dieses Phänomens dürfen wir auf die Abhandlung obiger Autoren hinweisen. Wir fanden, daß eine solche Störung fast nur bei Elementen auftritt, die sowieso nicht zu einer absoluten oder relativen Durchströmungsmessung zu gebrauchen sind.

3. Elemente vom modifizierten Typ M.

Die Eichungen dieser neun Elemente ergaben folgendes:

a) Die Voraussetzungen für eine absolute Durchströmungsmessung besitzt kein Element.

b) Zur Feststellung relativer Durchblutungswerte eignen sich zwei Elemente ($\approx 22\%$).

c) Vier Elemente ($\approx 44\%$) sind nur in den Fällen zu gebrauchen, in denen die Richtung der Durchblutungsänderung festgestellt werden soll.

d) Drei Elemente ($\approx 33\%$) mußten wegen Unbrauchbarkeit verworfen werden.

e) Die Exponenten sind annähernd von gleicher Größe wie diejenigen der Typen A.

4. Elemente zur blutigen Durchströmungsmessung.

Bei diesen Elementen kommt die aufzuheizende Durchströmungsflüssigkeit direkt mit den Heizelektroden bzw. Thermolötstellen in Berührung. Sie müssen zu diesem Zweck bei in vivo-Versuchen in das Blutgefäß eingebunden werden. Von den sieben Elementen dieser Gruppe gehören fünf zum Typ N und zwei zum Typ A.

a) Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Elementen gaben fünf von den sieben Elementen ($\approx 71\%$) bei mindestens dreimaliger Eichung in einer Stromrichtung quantitativ übereinstimmende Eichkurven (zwei davon erst nach Umarbeitung). Damit ist ein relativ hoher Prozentsatz dieser Elemente zu einer absoluten Durchströmungsmessung geeignet.

b) Die restlichen beiden Elemente zeigen Übereinstimmung in ihren Exponenten, nicht aber in ihren relativen Heizintensitäten bzw. Galvanometerausschlägen. Sie können nur zur Messung der prozentualen Strömungsänderung Verwendung finden.

c) Die Exponenten sind im Durchschnitt größer als die entsprechenden der Typen A und N, obwohl die Elemente in der Art und Anlage der Heizelektroden und der Thermolötstellen den Elementen vom Typ A bzw. N gleichen. So ergibt sich bei den fünf Elementen nach Art des Types N eine mittlere Exponentengröße von 0,57, bei den beiden nach Art des Types A ein Exponent von durchschnittlich 0,8.

Besprechung der Ergebnisse.

Vorstehende Ergebnisse, die hinsichtlich ihrer prinzipiellen Deutung weitgehend als überzufällig zu betrachten sind, da sie auf einer größeren Zahl von Untersuchungen beruhen, berechtigen zu gewissen Folgerungen bezüglich unserer Themenstellung und damit zusammenhängender Fragen.

1. Versteht man unter einer quantitativen Durchblutungsmessung die Angabe absoluter Durchflußwerte, so können wir uns nicht dazu entschließen anzuerkennen, daß eine solche Registrierung mit der Diathermie-Thermostromuhr unter Verwendung von Thermoelementen zur unblutigen Durchströmungsmessung möglich ist, will man nicht einen Fehler in Kauf nehmen, der den Wert einer solchen Messung zweifelhaft erscheinen läßt. Von insgesamt 40 derartigen Elementen ergab nur ein

Element quantitativ übereinstimmende Eichkurven bei einer Fehlerbreite von $\pm 20\%$, ein weiteres bei einer Fehlerbreite von schon annähernd $\pm 30\%$. Überdies kann man nicht sicher sein, bei einer Serie von Eichungen in dem einen oder anderen Fall, sofern nur genügend Eichungen durchgeführt werden, ein übereinstimmendes Ergebnis zu erhalten; ferner ist in Rechnung zu stellen, daß die äußeren Bedingungen zur Reproduktion derselben Werte bei den Modelleichversuchen optimal und daher günstiger sind als *in vitro*. Die Aussichten sind also sehr gering, bei einem Versuch absolute Durchflußwerte zu erhalten. Wenn wir die einleitend zitierten Autoren richtig verstehen, so befinden wir uns mit dieser Feststellung in Übereinstimmung mit den von ihnen gezogenen Folgerungen. Anders verhält es sich mit den Elementen zur blutigen Durchströmungsmessung. Mit diesen dürften in den meisten Fällen genaue Resultate zu erzielen sein.

Wichtig ist, bei Prüfung der Elemente sich den Versuchsbedingungen *in vivo* insofern anzugleichen, als die Eichungen nicht hintereinander an derselben Vene bei unveränderter Elementlage vorgenommen werden, da sonst günstigere Beziehungen aufgezeigt werden, als unter den tatsächlichen Verhältnissen *in vivo* vorliegen. Wir leiten damit zu der Frage über, ob die blutige Eichkontrolle am Ende eines Versuches mit *in situ* belassenem Gefäß genügende Sicherheit für eine absolute Messung bietet. CERLETTI u. ROTHLIN bejahen diese Frage und auch WICK äußert sich in positivem Sinne. Wir wollen hier nicht auf die Schwierigkeit einer solchen Messung und die weitgehende Abhängigkeit von dem untersuchten Gefäßgebiet eingehen. Sicherlich hängt das Ergebnis einer solchen blutigen Eichkontrolle zum Teil von der Genauigkeit und Experimentierkunst des jeweiligen Untersuchers und der Größe seines Mitarbeiterstabes ab. Voraussetzung aber bleibt unseres Erachtens für eine solche blutige Nachkontrolle, daß mit Elementen gearbeitet wird, die sich zu einer absoluten Durchströmungsmessung eignen, und das sind, wie aufgezeigt wurde, nur äußerst wenige. Denn die bei der blutigen Schluß Eichung erhaltene Eichkurve liefert ja nur dann eine Gewähr für die Gültigkeit ihrer Meßwerte auch während des Versuchs, wenn sie nach $G_1 : G_2 = I_1^2 : I_2^2$ in einer quantitativen Beziehung zu den Modelleichungen steht. Dies ist aber nur möglich, wenn die Modelleichungen unter sich quantitativ übereinstimmen. In allen anderen Fällen kann nicht ausgeschlossen werden, daß das während des Versuches benutzte Element bis zum Einsetzen der blutigen Schluß Eichung mit einer Veränderung seiner Charakteristik oder im günstigeren Falle nur der Ausschlagsintensität reagiert hat, da selbst bei schonendstem Vorgehen es unmöglich sein dürfte, alle bekannten und unbekannten Faktoren, die die Reaktion des Elementes zu beeinflussen vermögen, konstant zu erhalten.

2. Erweitert man den Begriff einer quantitativen Durchströmungsmessung und dehnt ihn auch auf die Fälle aus, in denen es nur auf die Feststellung relativer Durchblutungsänderungen ankommt, so sind mit der Diathermie-Thermostromuhr nach eingehender Prüfung der Elemente und unter kritischer Auswertung der erhaltenen Kurven durchaus brauchbare Resultate zu erzielen. Voraussetzung ist in jedem Fall, daß das Element in einer Stromrichtung mindestens 3 mal (besser noch öfter) an verschiedenen Venen geeicht worden ist und dabei übereinstimmende Exponenten ergeben hat. Mit einer einmaligen Eichung ist über Charakteristik und Qualität eines Elementes nichts ausgesagt! Die Eichungen sollen nach Möglichkeit mit Blut durchgeführt werden; für orientierende Eichungen genügt Kochsalzlösung.

Die Anzahl der Elemente, die sich für eine derartige Durchströmungsmessung eignen, ist relativ gering. Unter unserem Material sind es 53% der Elemente vom Typ A (einschließlich der beiden unter 1. erwähnten Elemente), 25% der Elemente vom Typ N und 22% der Elemente vom Typ M, die bei öfters wiederholten Eichungen eine stets gleichbleibende Charakteristik aufwiesen. Wir können uns damit der Auffassung von WICK nicht anschließen, „daß es nicht möglich erscheint, für ein Thermo-element allein eine stets gültige Charakteristik aufzustellen“. Die in oberen Zahlen zum Ausdruck kommende bessere Qualität der Elemente vom Typ A erscheint uns mehr als zufallbedingt, da diese Elemente nicht nur in den Modelleichungen konstantere Ergebnisse lieferten, sondern sich auch bei in vivo-Versuchen den Elementen vom Typ N hinsichtlich der Konstanz der erhaltenen Kurven überlegen erwiesen. Wir möchten daher nicht prinzipiell den Elementen vom Typ N den Vorzug geben, sondern es jeweils von Charakteristik und Qualität des einzelnen Elementes auf der einen Seite, Fragestellung und Untersuchungsort auf der anderen Seite abhängig machen, welchen Elementtyp man benutzt. CERLETTI u. ROTHLIN haben sich in ähnlichem Sinne geäußert. An Arterien ist nur der Elementtyp A zu verwenden; die Benutzung der Elemente vom Typ N ist hier nach REIN als Kunstfehler zu betrachten (siehe auch DÖRNER). Wie oft aber kommt in neueren Arbeiten auch an Arterien der Elementtyp N zur Anwendung!

3. Die große Variabilität in der Güte der einzelnen Thermoelemente und deren Bedeutung für die Zuverlässigkeit der Versuchsergebnisse sollten dazu führen, bei Stromuhrarbeiten nicht zuletzt im Interesse der Methode nähere Angaben über Art, Exponenten und Qualität der verwendeten Thermoelemente zu machen, um dem Außenstehenden tiefere Einblicke in das methodische Geschehen zu ermöglichen. Leider werden dem Leser solcher Arbeiten in der weitaus überwiegenden Mehrzahl derartige Angaben vorenthalten, eine Gewohnheit, die mit dazu beitragen dürfte, zu nicht immer unberechtigten Kritiken herauszufordern.

Zusammenfassung.

Die Prüfung von 47 Thermoelementen (15 vom Typ A, 16 vom Typ N, 9 von einem modifizierten Typ M, 7 zur blutigen Durchströmungsmessung) in 366 Modelleichungen, von denen 246 in vorliegender Arbeit ausgewertet wurden, ergab folgendes:

1. Von den 40 Elementen zur unblutigen Durchströmungsmessung besitzt ein Element vom Typ A die Voraussetzungen zu einer absoluten Durchströmungsmessung unter Einbeziehung einer Fehlerbreite von $\pm 20\%$, ein weiteres bei einer Fehlerbreite von annähernd $\pm 30\%$.

2. Von den 7 Elementen zur blutigen Durchströmungsmessung eignen sich 5 zu einer absoluten Durchblutungsregistrierung.

3. Von unserem Material sind 53% der Elemente vom Typ A (einschließlich der beiden unter 1. erwähnten Elemente), 25% der Elemente vom Typ N und 22% der Elemente vom Typ M zu einer Durchströmungsmessung zu gebrauchen, bei der es lediglich auf die Feststellung von Relativänderungen ankommt.

4. Die restlichen Elemente eignen sich entweder nur zur Feststellung der Richtung der Durchblutungsänderung oder sie sind ganz zu verwerfen.

5. Die Ergebnisse werden diskutiert und festgestellt, daß die Thermostromuhrmethode bei unblutiger Anwendung zur Erhebung von Relativwerten durchaus geeignet ist, dagegen für eine absolute Messung kaum und auch bei blutiger Schlußzeichnung nur in seltenen Fällen in Frage kommt.

Literatur.

CERLETTI, A., u. E. ROTHLIN: Über die Thermostromuhrmethode. *Helvet. physiol. Acta* **6**, 92 (1948). — DÖRNER, J.: Fehlermöglichkeiten bei der Durchblutungsmessung mit der Diathermie-Thermostromuhr nach H. REIN. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **220**, 490 (1953). — ENGELHORN, R., K. GÖRTTLER, G. GRUPP u. S. JANSSEN: Durchblutungsstörungen in der Niere. 20. Tag. Dtsch. Pharmacol. Ges. Bonn 1953. — REIN, H.: Über Durchblutungsmessungen an Organen in situ, insbesondere mit der Thermostromuhr. *Erg. Physiol.* **45**, 514 (1944). — Persönliche Mitteilung. — SCHMIDT, W., u. W. BOGUTH: Zur Eichung REINScher Thermoelemente. *Ärzt. Forsch.* **7**, II/65 (1953). — WICK, H.: Kreislaufwirkung neuer adrenalinverwandter Substanzen. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **205**, 490 (1948).

Dozent Dr. med. J. DÖRNER, Pharmacol. Institut der Med. Akad. Gießen,
z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

II. Medizinische Universitätsklinik Frankfurt a.M.
(Direktor: Prof. Dr. M. GÄNSSLEN).

Eine chromatographische Methode zur Bestimmung des Isonicotinsäurehydrazid.

Von
FRED LEUSCHNER.

(Eingegangen am 28. November 1953.)

Seit der Einführung des Isonicotinsäurehydrazids (INH) in die Therapie der Tuberkulose wurde für die quantitative Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen, deren Ergebnisse aber zum großen Teil aus methodischen Gründen nicht vergleichbar sind.

S. H. RUBIN u. Mitarb., V. MORVILLO u. S. GARATTINI und M. SCHOOG zeigten chemische Bestimmungsmöglichkeiten, mit denen der Pyridinring am INH nachgewiesen wird. J. M. KELLY u. R. B. POET, G. RUBINO u. N. BRACCO, O. WOLLENBERG und H. WOJAHN u. E. WEMPE entwickelten Bestimmungsverfahren der Hydrazingruppe des INH. Den chemischen Methoden stehen die mikrobiologischen von F. J. GEKS, K. LIEBERMEISTER und R. BÖNICKE gegenüber. Während die methodischen Fehler der chemischen Verfahren im wesentlichen in der unzureichenden Extraktion und unspezifischen Färbung zu suchen sind, fußen sie bei den mikrobiologischen Arbeitsgängen in Meßfehlern, Schwankungen des Nährboden-substrates, in veränderten Eigenschaften des Teststammes und in der Unspezifität durch tuberkulostatisch wirksame Stoffwechselprodukte des INH.

Der von uns eingeschlagene Weg benutzt die verteilungschromatographische Trennung zur Bestimmung des INH. Zum qualitativen Nachweis der INH-Flecke auf einem Vergleichschromatogramm kann die grünblaue Fluoreszenz im UV-Licht nach BrCN-Behandlung herangezogen werden. Dieser qualitative Nachweis gestattet bei Berücksichtigung der R_f -Werte eine Abtrennung von verwandten Substanzen. Zur quantitativen Bestimmung wurde das Eluat mit p-Dimethylaminobenzaldehyd angefärbt und im Stufenphotometer gemessen.

Experimentelles Vorgehen.

Für die Verteilungschromatographie wurde die aufsteigende, zweidimensionale Methode ausgewählt. Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b wird in Quadrate von 29×29 cm Größe geschnitten, an 2 aufeinanderstoßenden Seiten 4 cm vom Rand mit den Startlinien markiert, zu einem Zylinder gerollt und Rand zu Rand genäht. Um das Papier zu reinigen, ließen wir das erste Lösungsmittelgemisch vorerst allein im Papier aufsteigen und dann an der Luft wieder abtrocknen. Die zu untersuchende Substanz wird mit Mikropipetten am Kreuzungspunkt der Startlinien

aufgetragen. Es empfiehlt sich, bei Benutzung der sogenannten Leukocytenpipetten (mit einem Volumen von 20 mm³) eine Eichung mit Quecksilber vorzunehmen. Die aufzutragende Substanz soll so bemessen sein, daß sie nach größenordnungsmäßiger Schätzung 1—25 µg INH enthält. Man soll wegen der Größe des Startfleckes niemals mehr als 20 mm³ Analysenlösung auf einmal auftragen, auch wenn eine größere Menge benötigt wird. Man trägt dann in mehreren Portionen auf, indem dazwischen immer wieder bei 80° C getrocknet wird. Die Papiere werden bei 20—22° C im Lösungsmittelgemisch der ersten Dimension entwickelt, bei 60° C getrocknet, umgenäht und in das Gemisch für die zweite Dimension gebracht. Als Entwicklungskammern werden Glaszylinder mit ebenem Boden und luftdichtem Verschluß benutzt. Die Glaszylinder sind mit einer 0,5 cm hohen Schicht Lösungsmittel aufgefüllt. Die notwendige Sättigung der Kammeratmosphäre wird erreicht, indem das Lösungsmittelgemisch 24 Std vor Beginn der Entwicklung in den Zylinder gefüllt wird. Zur Entwicklung der Chromatogramme fanden wir eine Reihe von polaren Lösungsmittelgemischen geeignet. Als Maßstab der Verwendbarkeit wurde

1. die Trennung des INH mit scharfen Substanzflecken von der Isonicotinsäure, vom Isonicotinsäureamid und den entsprechenden Nicotinsäurederivaten,

2. die Trennung von Substanzen aus Harn und Harn- oder Serumextrakten nach J. M. KELLY u. R. B. POET, die mit p-Dimethylaminobenzaldehyd farbstoffbildend sind, und

3. die fehlende Beeinflussung der Färbemethoden durch möglicherweise nach dem Trocknen der Chromatogramme zurückgebliebene Spuren von Lösungsmittel angesehen.

Für die Trennung erwiesen sich zunächst Kombinationen von heterocyclischen Verbindungen (α -Picolin, Pyridin, Tetrahydrofuran, Dioxan) mit Wasser gut geeignet, jedoch störten zurückgebliebene Spuren die Nachweismethoden, bei denen BrCN und p-Dimethylaminobenzaldehyd verwendet wird. Aliphatische Alkohole erfüllen dagegen alle Bedingungen.

Am günstigsten erwiesen sich folgende Kombinationen: Erste Dimension: Wassergesättigter sekundärer Butylalkohol: sekundärer Butylalkohol wird im Schüttelzylinder mit mindestens 12,5% Wasser gemischt, gut durchgeschüttelt und bis zur Trennung der beiden Phasen stehen gelassen. Zur Chromatographie wird die obere Phase verwendet. — Zweite Dimension: Ein Gemisch aus 56 Teilen Isoamylalkohol, 24 Teilen Aceton, 6 Teilen Eisessig und 14 Teilen Wasser: Isoamylalkohol reinst der Firma Merck, Darmstadt, wird 2 mal mit den gleichen Volumen 10%iger Salzsäure, 2 mal mit 10%iger Natronlauge und 3 mal mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt; Aceton der Firma Merck, Darmstadt, für chromatographische Zwecke; Eisessig pro analysi.

Die Entwicklung wird solange fortgeführt, bis die Lösungsmittel ungefähr 1 cm unter den oberen Rand des Papiere gestiegen sind. Die Front wird markiert und das Papier bei 80° C getrocknet. Die qualitative Charakterisierung auf den Chromatogrammen kann mit folgenden Farbreaktionen vorgenommen werden (LEUSCHNER):

1. Fluorescenz mit BrCN und Natronlauge,
2. Gelbfärbung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und
3. Rotfärbung mit Selendioxyd.

Zur Abtrennung der Isonicotinsäure, der Nicotinsäure und der dazugehörigen Amide eignet sich die BrCN-o-Phenylendiamin-Methode (LEUSCHNER). Die qualitative Bestimmung muß auf einem Vergleichschromatogramm vorgenommen werden,

denn keine der Färbemethoden gestattet eine spätere fehlerfreie quantitative Messung.

In den beschriebenen Lösungsmittelgemischen ergaben sich folgende R_F -Werte (Tab. 1). Im Harn erniedrigte sich der R_F -Wert des INH um etwa 10%.

Tabelle 1.

	wassergesättigter sekundärer Butylalkohol 1. Dimension	Isoamylalkoholgemisch 2. Dimension
Isonicotinsäurehydrazid	0,69—0,74	0,64—0,67
Isonicotinsäure	0,26—0,32	0,50—0,54
Isonicotinsäureamid	0,77—0,79	0,54—0,56
Nicotinsäure	0,33—0,37	0,62—0,65
Nicotinsäureamid	0,79	0,58—0,59

Quantitative Auswertung.

Aus den Chromatogrammen wird jeweils das Papierstückchen herausgeschnitten, auf dem im Vergleichschromatogramm INH mit den oben beschriebenen Methoden oder bei Konzentrationen über 20 μg auf dem zu eluierenden Chromatogramm im UV-Licht als dunkler Fleck qualitativ nachgewiesen werden kann. Das Papierstückchen kann groß genug gehalten werden, denn INH-freies Untersuchungsmaterial zeigt in den fraglichen Chromatogrammabschnitten keine die Farbereaktionen störenden Substanzen. Bei unserer Versuchsanordnung wurde in der Regel ein Feld ausgeschnitten, das in beiden Richtungen den doppelten Durchmesser des qualitativ nachgewiesenen Fleckes besaß. Die Papierstücke werden zerschnitten und durch 10 min Schütteln in n/10 Salzsäure eluiert. 1 ml davon wird in ein Zentrifugenglas überführt, mit 0,2 ml 6 n Salzsäure und 0,3 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens versetzt (0,6 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 10 ml Äthylalkohol und 1 ml 12 n Salzsäure gelöst; das Reagens muß täglich frisch bereitet werden), für 45 min in ein siedendes Wasserbad gebracht und dann mit n/10 Salzsäure bis zur 2 ml-Marke aufgefüllt. Gelegentlich vorhandene Papierfasern werden abzentrifugiert. Die Bestimmung erfolgt im Anschluß an die Abkühlung im PULFRICH-Stufenphotometer mit Filter S 41 unter Verwendung von 5 cm-Mikroküvetten gegen die Leerlösung eines gleich großen, substanzfreien Papierstückes aus den Chromatogrammabschnitten unterhalb der Startlinien. Der sich mit p-Dimethylaminobenzaldehyd bildende Farbstoff (PESEZ u. PETIT) folgt dem LAMBERTSchen Absorptionsgesetz. Der Extinktionsmodul für eine Lösung, die in 1 ml n/10 Salzsäure 2 μg INH enthielt, betrug bei unserer Versuchsanordnung 0,18. Im Eluat aus den Papierchromatogrammen lassen sich sicher 0,5 μg

INH/ml n/10 Salzsäure nachweisen. Bei Bestimmungen von Standardlösungen ergaben sich die in Tab. 2 angeführten Resultate.

Tabelle 2.

Zahl der Bestimmungen	Aufgetragene Menge INH	Wiedergefundene Menge in %	Verlust in %	σ Verlust in %
22	5—20 μ g	M = 90,3	M = 9,7	4,7

Bestimmung im Harn.

Der Harn wird im Kühlschrank gesammelt und gegebenenfalls mit 2 n Salzsäure oder 2 n Natronlauge auf pH 6—7 eingestellt. Der Harn kann unmittelbar auf die Chromatogramme aufgetragen werden, wenn gleich sich die Verwendung des neutralisierten salzsauren Extraktes nach J. M. KELLY u. R. B. POET als fehlerfreier erwiesen hat. Die Menge ist von der größenordnungsmäßigen INH-Konzentration abhängig zu machen. Werden Konzentrationen über 25 μ g INH/ml Harn oder Extrakt erwartet, so sind 5—100 mm³ auf jeweils 2 Chromatogramme aufzutragen. Bei Konzentrationen unter 25 μ g INH/ml werden 30 ml im Wasserstrahlvakuum sehr vorsichtig zur Trockne eingedampft, 2 mal mit 1 ml Wasser aufgenommen, auf 3 ml mit Wasser aufgefüllt und zentrifugiert. Das klare Überstehende wird für die Chromatographie gebraucht. Beim raschen Eindampfen im Vakuum können Verluste bis 20% eintreten. Einengung des Harnes über das 10fache hinaus erwies sich für die Ausbildung eluierbarer Flecke als ungeeignet.

Die chromatographische Bestimmung von INH im unmittelbar aufgetragenen Harn zeigte die in Tab. 3 zusammengefaßten Ergebnisse.

Tabelle 3.

Zahl der Versuchspersonen	Peroral verabreichte Dosis	Harnausscheidung in % der verabreichten Dosis				
		Stunden				gesamt in 24 Std
		0—3	3—6	6—9	9—24	
8	10 mg/kg	M = 7,4	M = 0,8	M = 0,1	0	M = 8,3
		σ = 2,6	σ = 0,3	σ = 0,1	0	σ = 2,7

Besprechung.

Der papierchromatographische Trennungsgang ist geeignet, aus den Stoffwechselprodukten des INH eine Hauptfraktion abzutrennen, die mit dem freien INH identisch zu sein scheint, wenngleich geringfügige Verkürzung des R_f -Wertes und Verschiebung des Farbtones der BrCN-Fluoreszenz des INH die Möglichkeit für das Vorliegen einer Verbindung des INH erwägen lassen (beide könnten auch als Effekt der Begleitsubstanzen gedeutet werden). Dem Harn nachträglich in äquivalenten Mengen hinzugefügtes INH verhält sich wie die ausgeschiedene Form. In

einer Reihe polarer Lösungsmittelgemische mit Dioxan, Benzol, Tetrahydrofuran, α -Picolin und Pyridin erwies sich die Fraktion unter Zugrundelegung der oben angeführten qualitativen Nachweismethoden als einheitlich.

Freie Isonicotinsäure, Isonicotinsäureamid und die entsprechenden Nicotinsäureverbindungen lassen sich gut abtrennen.

Die Ungenauigkeit der Methode wird bei Berücksichtigung der Fehlerbreite von Standardlösungen mit maximal $\pm 25\%$ einzuschätzen sein. Die Fehlerquellen sind bei Konzentrationen unter $25 \mu\text{g INH/ml}$ Analysenlösung hauptsächlich in der Einengung der Lösung, bei höheren Konzentrationen in Adsorptionsverlusten auf dem Papier und seltener in störenden Harnbeimengungen zu suchen.

Zusammenfassung.

Es wird eine papierchromatographische Methode zur Bestimmung des INH vorgeschlagen. Tertiäre Nicotinsäure- und Isonicotinsäurederivate werden durch BrCN-Fluoreszenz bzw. BrCN-o-Phenylendiamin-Färbung differenziert. Nach Eluierung des INH wird mit p-Dimethylaminobenzaldehyd quantitativ bestimmt.

Literatur.

BÖNICKE, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **216**, 490 (1952). — GEKS, F. J.: Klin. Wschr. **1952**, 1041. — KELLY, J. M., u. R. B. POET: Am. Rev. Tbc. **65**, 484 (1952). — LEUSCHNER, F.: Naturwissenschaften **40**, 554 (1953). — LIEBERMEISTER, K.: Tuberkulosearzt **6**, 492 (1952). — MORVILLO, V., u. S. GARATTINI: Seduta della Soc. Lomb. di Sci. Med. e Biol. sulla idrazide dell' acido isonicotinico 1952. — PESEZ, M., u. A. PETIT: Bull. Soc. Chim. **14**, 122 (1947). — Ref. Chem. Zbl. **1948**, I, 1438. — RUBIN, S. H., L. DREKTER, J. SCHEINER u. E. DE RITTER: Diseases of the Chest **21**, 439 (1952). — RUBINO, G., u. N. BRACCO: Minerva med. (Torino) **1952**, 2. — SCHOOG, M.: Münch. med. Wschr. **1952**, 2136. — WOJAHN, H., u. E. WEMPE: Arzneimittel-Forsch. **3**, 191 (1953). — WOLLENBERG, O.: Klin. Wschr. **1952**, 906.

Dr. FRED LEUSCHNER, Erlangen, Membacher Weg 15.

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. SEITZ).

Über die Beeinflussung der Schlafzeit nach Pentothal-Natrium bei normalen und nebennierenlosen Ratten durch Glucose und Fructose.

Von

KONRAD STUHLFAUTH und ANNELIESE ENGLHARDT-GÖLKE.

(Eingegangen am 20. September 1953.)

Daß die Fähigkeit des Organismus, Noxen verschiedenster Art zu überwinden, eng mit dem Stoffwechsel, besonders der Kohlenhydrate (KH), in Zusammenhang steht, konnte vielfach erwiesen werden. So können z. B. bestimmte Entgiftungsreaktionen wie Glucuronidbildung (LIPSCHITZ), Acetylierung (HELMREICH), Alkoholabbau (GREMELS, KLEIN, STUHLFAUTH u. NEUMAIER, PLETSCHER u. Mitarb., WESTERFIELD STOTZ u. BERG) unter dem Einfluß der besonders stoffwechselaktiven Fructose und ihrer Intermediärprodukte, vor allem der Brenztraubensäure beschleunigt ablaufen. Die deutlich weckende und belebende Wirkung, die STUHLFAUTH bei Alkoholvergifteten nach Laevulosegaben beobachtete, ließ sich später in einigen therapeutischen Versuchen auch in abgeschwächtem Maße bei Schlafmittelvergiftungen nachweisen. Die Annahme, daß die Fructose auf dem Weg über eine Steigerung des Verbrennungsstoffwechsels, die wohl das gemeinsame Prinzip aller dieser Effekte darstellt, auch die Barbituratnarkose beeinflussen könnte, gab Anlaß, diese Wirkung in einer größeren Versuchsreihe experimentell zu überprüfen.

Über den Einfluß einiger Substrate aus dem Intermediärstoffwechsel der KH auf die Barbituratnarkose liegen bereits einige Beobachtungen vor:

Durch in vitro-Versuche konnte SHIDEMANN nachweisen, daß der Abbau von Thiopental (= Pentothal) in Homogenaten von Gehirn, Leber und Niere durch Intermediärprodukte des Citronensäurezyklus: Citronensäure, Fumarsäure, Bernsteinsäure und α -Ketoglutar Säure wesentlich beschleunigt wird, ebenso durch Zugabe der Cofaktoren Cytochrom C, ATP und Nicotinsäureamid. Die Ergebnisse bestimmter Tierexperimente schienen zunächst ebenfalls auf eine Abkürzung der Barbituratwirkung durch Vermehrung der Oxydationen im Citronensäurezyklus hinzuweisen. 1943 beschrieben SOSKIN und TAUBENHAUS eine Weckwirkung der Bernsteinsäure in Fällen von Barbiturat-Vergiftungen in vivo. WESTFALL (1946) beobachtete eine deutliche analeptische Wirkung von Insulin, Adrenalin, Brenztraubensäure und Bernsteinsäure. Später konnte der Bernsteinsäureeffekt von SCHACK und GOLDBAUM nicht bestätigt werden. In den Experimenten von LAMSON, GREIG und HODDY traten überraschenderweise sogar völlig entgegengesetzte Wirkungen auf. Sie fanden, daß Glucose sowie eine Reihe von Stoffen des Zwischenstoffwechsels, gegen Ende der Narkose gegeben, den anaesthetischen Effekt der

Barbiturate verstärkten. Einige von ihnen — Brenztraubensäure, Milchsäure und Glutaminsäure — schienen auch den Eintritt des Barbiturats in die Gehirnzellen zu begünstigen, da der Barbituratgehalt des Gehirns nach Vorbehandlung mit diesen Stoffen höher gefunden wurde als bei den Kontrolltieren.

Diese zum Teil in wesentlichen Punkten differierenden Ergebnisse können nur durch die Vielzahl der Faktoren erklärt werden, die die Wirkungsweise und das Schicksal der Barbiturate im Organismus bestimmen. Es ist bekannt, daß sich durch Änderung der Ausgangsbedingungen oder der Narkosetiefe völlig verschiedenartige Wirkungen erzielen lassen. So ist z. B. bei hohen Barbituratkonzentrationen der O_2 -Verbrauch der Gewebe deutlich herabgesetzt, während er bei niedrigen sogar gesteigert gefunden wurde (WESTFALL 1951). Es ist daher notwendig, zur Erzielung übersichtlicher Ergebnisse bei solchen Problemstellungen die Versuchsbedingungen mehrfach zu variieren.

In unseren eigenen Untersuchungen über den Einfluß einer Stimulation des KH-Stoffwechsels auf den Verlauf der Barbituratnarkose haben wir daher nicht nur verschiedene Barbituratkonzentrationen und KH-Dosen, sondern auch unterschiedliche Zeitpunkte des Eingriffs in den Ablauf der Narkose gewählt. Als Barbiturat verwendeten wir Pentothal-Natrium, als wichtigste Substrate des KH-Stoffwechsels Glucose und Fructose. Wegen der bekannten gesteigerten Ansprechbarkeit nebennierenloser Tiere für Barbiturate (EICHHOLTZ u. Mitarb.) wurden die Versuche auch an einer Reihe von epinephrektomierten Tieren durchgeführt.

Eigene Untersuchungen.

Methode. Zu ihrer Durchführung hat sich der Pentothal-Natrium-Schlafstest von EICHHOLTZ als geeignet erwiesen. Er hatte an mehreren hundert Tieren gefunden, daß normale Ratten nach kleinen Dosen Avertin- und Pentothal-Natrium an mehreren Tagen, sogar bei Wiederholung am selben Tag, konstante Schlafzeiten aufweisen — vorausgesetzt, daß einheitliches Tiermaterial verwendet wird. Mit einigen Modifikationen verfahren wir wie folgt:

161 gesunde Albinoratten von 70–150 g wurden in Gruppen zu je 15 bis höchstens 30 Tieren eingeteilt, wobei die Tiere einer Gruppe stets vom gleichen Stamm waren. Sie erhielten mehrere Tage ein Futter konstanter Zusammensetzung und blieben unmittelbar vor dem Versuch 12 Std nüchtern. Zwischen den einzelnen Testungen legten wir eine 2tägige Pause ein. Pentothal-Natrium wurde als 1% ige Lösung zu 15–30 mg/kg innerhalb 1 min in die leicht gestaute Schwanzvene injiziert. Die von EICHHOLTZ gewählte Dosierung von 15 mg/kg Pentothal-Natrium, die konstante Schlafzeiten von 20–40 sec ergab, wurde von uns auf 20 mg/kg erhöht, da sich sonst eine Verkürzung dieser an sich schon minimalen Schlafzeiten nicht mehr statistisch sichern läßt. Fructose und Glucose gaben wir als 40% ige Lösung 1. 5 bis 10 min vor, 2. unmittelbar nach Pentothal-Natrium oder 3. nach der halben Schlafzeit, ebenfalls i. v. in Dosen von 1,2–1,6 g/kg. Das Ende der Narkose ließ sich an dem spontanen Aufrichten der Tiere aus der Seitenlage gut erkennen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem Kriterium von CHAUVENET, wodurch zufällige Extremabweichungen ausgeschlossen werden können, wenn sie größer als $\frac{1}{\sigma} (x - m)$ sind. Dabei ist σ die Streuung der Verteilung, $(x - m)$ die Abweichung vom Mittelwert. Die Berechnung der Signifikanz wurde nach GEBELEIN und HEITE (statistische Urteilsbildung) durchgeführt.

Ergebnisse.

Normaltiere.

a) *Pentothal-Natrium* (Äthyl[-1-Methyl-butyl]thiobarbitursaures Natrium): Bei unserer Dosierung betrug die durchschnittliche Schlafzeit 6 min 58 sec, berechnet aus den Werten der Gruppen I, II, III und V. Wie wir beobachteten, nahm allerdings mit der Länge der Schlafzeit auch die Streuung zu, so daß wir die geringe Schwankungsbreite der EICHHOLTZschen Versuche nicht erzielen konnten. Dagegen differierten die bei Wiederholung desselben Versuches am Einzeltier gewonnenen Werte nur außerordentlich wenig, so daß streng genommen bei der Auswertung der Ergebnisse jedes Tier als seine eigene Kontrolle dienen konnte. Da jedoch auch der gesamte Mittelwert des Versuchs bei einer Tiergruppe sich in mehreren Versuchsreihen kaum änderte, kann das Gesamtergebnis je einer Tierreihe mit und ohne Zucker verglichen werden.

b) *Fructose*, 5—10 min vor Pentothal (20 mg/kg) gegeben, führte zu einer deutlichen Verkürzung der Schlafzeit. Es kam meist nicht einmal mehr zu einem eigentlichen „Einschlafen“ der Tiere, dagegen trat ein kurzes Excitationsstadium mit Tachypnoe, reflektorischen Zuckungen und taumelnden Bewegungen auf. Die typische Seitenlage wurde oft gar nicht eingenommen. Bei längeren Schlafzeiten durch höhere Barbituratdosen nahm der Fructoseeffekt mit steigender Dosis ab. Während bei 25 mg/kg und wenig verlängerter Schlafzeit die Wirkung der Fructose noch signifikant war, lag sie bei 30 mg/kg innerhalb der Streuungsbreite (s. Tab. 1).

Glucose, vor Pentothal injiziert, zeigte bei kurzer Narkosedauer keinen Einfluß auf die Schlafzeit. Bei längeren Schlafzeiten hatte sie ebenfalls keine deutliche Weckwirkung.

c) Wurden beide Zucker in unmittelbarem Anschluß an Barbiturat gegeben, d. h. nach Eintritt der Narkose, schliefen die Tiere wie gewöhnlich ruhig ein, das Wiedererwachen erfolgte jedoch früher als bei den Kontrollversuchen. Auch hier waren Glucose und Fructose gleich wirksam. Mit steigenden Dosen nahm die belebende Wirkung der Zucker ab.

d) Nach Ablauf der halben Schlafzeit gegebene Zuckerinjektionen hatten keinerlei Weckwirkung mehr (14 Tiere). Versuchten wir diese nach 30 mg/kg in tiefer Narkose liegenden Tiere mit Zuckergaben zu wecken, so traten nach Glucose wie nach Fructose noch während der Injektion heftige Krämpfe auf. Danach schliefen die Tiere wieder ruhig weiter, die Gesamtschlafdauer wurde nicht beeinflusst.

Nebennierenlose Tiere.

Diese zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegen viele Noxen, die allgemein als eine Störung der Adaptionsfähigkeit angesehen wird und

Tabelle 1. *Beeinflussung der Schlafzeit normaler und nebennierenloser Ratten nach Pentothal durch Glucose und Fructose.*

Gruppe	Zahl der Tiere im Versuch	Dosis Pentothal in mg/kg	Durchschnitt der Schlafzeit nach Pentothal in min/sec	Mittlere Abweichung des Mittelwerts min/sec	Durchschnitt der Schlafzeit nach Pentothal + Fructose min/sec	Mittlere Abweichung des Mittelwerts min/sec	Signifikante Differenz ² der Schlafzeit ohne und mit Fructose	Durchschnitt der Schlafzeit nach Pentothal + Glucose min/sec	Mittlere Abweichung des Mittelwerts min/sec	Signifikante Differenz der Schlafzeit ohne und mit Glucose	Zeitlicher Abstand der Glucose- und Fructoseinjektion vom Beginn der Narkose
I, II, II	60	20	6.09	2.20	0.47	10	13.99 (3.11)	6.47	13	—	5—10 min vor Pentothal
IV	20	30	51.0	12.40	47.12	7.35	—	45.36	8.52	—	5—10 min vor Pentothal
V	20	20	7.40	44	3.40	65	3.63 (3.36)	3.22	39	4.53— (3.36)	unmittelbar nach Pentothal
VI	20	25	7.44	34	3.46	43	3.73— (3.36)	4.58	56	—	unmittelbar nach Pentothal
VII	14	30	50.0	11.30	49.17	11.30	—	47.43	11.03	—	nach der halben Schlafzeit
VII ¹	9	15	17.20	3.10	—	—	—	—	—	—	unmittelbar nach Pentothal
	9	15	—	—	1.37	53	4.93— (3.71)	—	—	—	
	9	15	—	—	—	—	+	4.13	55	4.14— (3.71)	

¹ Epinephrektomierte Tiere.² Nach H. GEBELIN und H. J. HERTE, Statistische Urteilsbildung. Berlin: Springer 1951.

() = Zufallsgrenze.

durch Nebennierenrindenhormone normalisiert werden kann. Sie betrifft nicht nur die Anpassung an Änderungen der Umgebungstemperatur, des osmotischen Gleichgewichts und Ionenmilieus, sondern auch die Entgiftung von Pharmaka. GROSS u. MEIER nehmen an, daß die erhöhte Toxizität, die Histamin und andere Substanzen, auch Schlafmittel, beim nebennierenlosen Tier besitzen, auf unzureichende Entgiftungsfunktionen zurückzuführen sind, da gewisse für Gehirn- und Leberzellen charakteristische Stoffwechselprozesse nicht mehr in der normalen Weise ablaufen.

In unseren Versuchen mit 15 mg/kg Pentothal-Natrium verlängerte sich trotz niedrigerer Barbituratdosis bei einer Gruppe von 9 Tieren die Schlafzeit von 7 min nach Nebennierenexstirpation auf durchschnittlich 17 min, allerdings mit einer beträchtlichen Streubreite innerhalb der Tiergruppe. Es scheint, daß je nach der individuellen Reaktion des Tieres der Zustand der Nebenniereninsuffizienz verschieden gut kompensiert wird. Bei EICHHOLTZ lagen die Werte der Schlafdauer nach Nebennierenexstirpation sogar zwischen dem 10- und 100fachen des normalen Wertes.

2 Gruppen von je 9 nebennierenlosen Tieren bekamen 5 Tage nach der Exstirpation dieselbe Barbiduratdosis injiziert. Unmittelbar danach wurde bei der einen Tierreihe Glucose, bei der anderen Fructose gegeben. Dadurch wurde bei beiden Gruppen eine signifikante Verkürzung der Schlafzeit erzielt. Eine völlige Normalisierung der Schlafzeit, wie sie durch wiederholte DOCA-Gaben erzielt werden kann (EICHHOLTZ), ließ sich auch durch Erhöhung der Zuckerdosis nicht erreichen. Leerversuche mit entsprechenden Mengen von physiol. Kochsalzlösung führten nicht zu einer Änderung der Schlafzeit.

Diskussion.

Die Schlafdauer nach Barbitalgaben wird im wesentlichen durch folgende Faktoren beeinflusst:

1. Grad der Verteilung und Anreicherung im Gewebe nach Überschreitung der Blutgewebsschranke.
2. Geschwindigkeit des Abbaus.
3. Stoffwechselhemmende Wirksamkeit durch Beeinflussung bestimmter Enzymsysteme der Nervenzellen.

Es entsteht nun die Frage, durch welche der vielseitigen, nicht nur energetischen, sondern auch osmotischen und elektrolytverschiebenden Wirkungen der Zucker die Barbituratnarkose beeinflusst werden kann.

ad 1. Bei Bestimmung der Plasmakonzentration von Pentothal-Na (Thiopenthal) nach intravenöser Injektion zeigen sich zwei Phasen (BRODIE). Die erste ist durch einen scharfen Abfall des Barbituratpiegels im Blut charakterisiert. Bei kleinen Ausgangsdosen erfolgt daher das Erwachen sehr rasch, da die für die Narkose notwendige Konzentration im

Plasma und Gehirn bald unterschritten wird. Das rasche Verschwinden des Barbiturats aus dem Blut ist nach Angaben BRODIES durch Abströmen des Pentothal ins Fettgewebe bedingt. Dabei hängt der Verteilungskoeffizient der Barbiturate zwischen Blut und Organgeweben einerseits und Fett andererseits von deren Dissoziationsgrad ab. Daher könnte das Auftreten neuer saurer Valenzen, z. B. organischer Säuren aus dem Intermediärstoffwechsel oder die vermehrt anfallende Kohlensäure im Zuge der Zuckerdissimilation die Verteilung des Pentothals beeinflussen. Es ist jedoch sehr fraglich, ob infolge der hohen Pufferkapazität der Gewebe eine solche Verschiebung der H^+ -Konzentration im Gewebe zustande kommen kann.

ad 2. Eine Abbaubeschleunigung der Barbiturate durch Intermediärsubstanzen aus dem Citronensäurezyklus im Sinne SHIDEMANS als Ursache der Schlafzeitverkürzung ist wenig wahrscheinlich, da dieser Abbau außerordentlich langsam erfolgt. Sogar nach dem Erwachen finden sich noch hohe Barbituratkonzentrationen in bestimmten Hirnteilen (GOLD-SCHMIDT, LAMPRECHT u. HELMREICH).

ad 3. Die eigentliche Wirkung der Barbiturate auf die Funktionen der nervösen Substanz erfolgt durch Eingriff in enzymatisch gesteuerte Stoffwechselabläufe, die neuerdings aufgeklärt werden konnten.

Der Angriffspunkt der Barbiturate im Organismus ist die sogenannte „oxydative Phosphorylierung“, d. h. derjenige Mechanismus, durch den in der Zelle die Bereitstellung von Energie für lebenswichtige Funktionen erfolgt. Während der gesamten Oxydationsprozesse des Verbrennungsstoffwechsels erfolgt in jeder Zelle durch Übertragung von anorganischen Phosphatresten auf ADP die Bildung von ATP als energiereicherer Bindung, die an vielen Synthesen im Organismus beteiligt ist. So ist auch die Acetylierung des Cholins, die zur Bildung von Acetylcholin als einer der Aktionssubstanzen der Nervenleitung führt; von der Anwesenheit der im Ablauf der oxydativen Phosphorylierung gebildeten ATP abhängig (NACHMANSON und MAKADO). Es ließ sich nun experimentell belegen, daß Barbiturate als sogenannte „Entkoppelungsgifte“ in diesen Mechanismus eingreifen können. BRODY und BAIN fanden in Untersuchungen an Mitochondrienpräparaten der Rattenleber, daß bei physiologisch wirksamen Barbituratdosen die Phosphataufnahme stärker herabgesetzt ist als der O_2 -Verbrauch, d. h. die Atmung war weniger beeinflußt als die Bildung energiereicher Phosphatbindungen. JOWETT und QUASTEL haben später auch den Beweis erbracht, daß während der Barbituratnarkose die oxydative Anbildung von ATP herabgesetzt und gleichzeitig die Acetylierung des Cholin gehemmt ist. In diesem Effekt sahen sie die Ursache der Änderung der funktionellen Aktivität des Nervengewebes.

Auf Grund dieser experimentellen Ergebnisse in vitro könnte die durch die vermehrte Glykolyse und Fructolyse gesteigerte Umsatzgeschwindigkeit des anorganischen Phosphats eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Weckwirkung darstellen. Eine solche Steigerung des Phosphat-Turnover konnte zumindest für Glucose von KVANNEN mit Hilfe von P 32 Isotopen nachgewiesen werden. Auch die Acetylcholinbildung läßt sich in atmenden Hirnschnitten erheblich steigern, wenn

Glucose zum Medium zugesetzt (HARPER u. QUASTEL) werden. Fructose muß in dieser Hinsicht noch wirksamer sein, da sie zumindest in der Leber wesentlich rascher dissimiliert wird und bei erreichter Sättigungskonzentration auch von der Hirnhexokinase vermehrt in die Dissimilation eingeschleußt wird (STEIN, CORI und CORI).

Bei langer und tiefer Narkose scheint der Mechanismus ein anderer zu sein. Hier ist nach experimentellen Beobachtungen der Gehalt an ATP und Kreatinphosphat im Gehirn erhöht (zit. nach WEIL-MALHERBE), was bedeutet, daß der zu Energieerzeugung notwendige Zerfall der Energiedonatoren in der Nervenzelle gehemmt ist (BRODIE).

Die von uns sowohl nach Glucose- wie Fructosegaben beobachteten Krämpfe (bei tiefer Narkose mit 30 mg Thiopental) können aber nach den Untersuchungen von RICHTER u. CROSSLAND nur durch akuten Zerfall von Acetylcholin erklärt werden. Ob der durch die Zuckergaben plötzlich gesteigerte Stoffwechsel auch zu einer Instabilität von Acetylcholin führt, kann vorerst nur vermutet werden. In eine ähnliche Richtung wiesen auch die Beobachtungen von GERLICH, der die mit Luminal erhöhte Elektrokrampf-Reizschwelle bei Ratten durch Laevuloseinjektion wieder senken konnte.

Zusammenfassung.

1. Die Schlafzeit von Ratten nach kleinen Gaben von Pentothal-Natrium (20 mg/kg) wird durch 5—10 min vorher injizierte Fructose wesentlich verkürzt. Bei höheren Dosen bleibt diese Weckwirkung der Fructose aus.

2. Unmittelbar nach dem Pentothal-Natrium gegeben, haben beide Zucker eine signifikante Verkürzung der Schlafzeit zur Folge.

3. Bei hohen Pentothalgaben (30 mg/kg) haben sie keinerlei Wirkung auf die Dauer der Narkose, führen jedoch, wenn sie im Stadium tiefer Narkose injiziert werden, vorübergehend zu Krämpfen.

4. Der Wirkungsmechanismus des Pentothals und seine Beeinflussung durch die Zuckergaben werden diskutiert.

Literatur.

- BAIN, J. A.: Fed. Proc. **11**, 653 (1952). — BRODIE, B. B.: Fed. Proc. **11**, 632 (1952). — BRODY, T. M., and S. A. BAIN: Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. **77**, 50 (1951). — EICHHOLTZ, F., R. HOTOVY, P. GOLLISCHON u. H. KNAUER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 576 (1949). — GEBELEIN, H., u. H. J. HEITE: Statistische Urteilsbildung. Berlin: Springer 1951. — GERLICH: Pers. Mitteilung. — GOLDSCHMIDT, ST., W. LAMPRECHT u. E. HELMREICH: Hoppe Seyler's Z. **292**, 125 (1953). — GREMELS, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 57 (1947). — GROSS, F., u. R. MEIER: Schweiz. Med. Wschr. **1951**, 949. — HARPER, P. H., and I. H. QUASTEL: Nature (Lond.) **164**, 779 (1949). — HELMREICH, E., ST. GOLDSCHMIDT,

W. LAMPRECHT u. F. RITZL: Hoppe Seyler's Z. **292**, 3/5, 184 (1953). — JOHNSTON, W. J., and I. H. QUASTEL: Nature (Lond.) **1953**, 601. — KLEIN, H.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. **39**, 704 (1949); **40**, 455 (1951). — KVANNEN, E.: J. Clin. Invest. **3**, 140 (1951). — LAMSON, P. D., G. E. GREIG and CH. J. HOBODY: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **103**, 460 (1951). — Science (Lancaster, Pa.) **110**, 690 (1949). — LIPSCHITZ, W. L.: Schweiz. med. Wschr. **1946**, 486. — NACHMANSON, D., and A. L. MACHADO: J. of Neurophysiol. **6**, 397 (1943). — PLETSCHER, A., BERNSTEIN u. H. STAUB: Helvet. physica Acta **10**, 74 (1952). — RICHTER, D., and I. CROSSLAND: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — SCHACK, I. A., and L. R. GOLDBAUM: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 315 (1949). — SHIDEMAN, F. E.: Fed. Proc. **11**, 640 (1952). — SLEIN, M. W., G. T. CORI and C. F. CORI: J. of Biol. Chem. **186**, 763 (1950). — SOSKIN, S., and M. TAUBENHAUS: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **78**, 49 (1943). — STUHLFAUTH, K., u. H. NEUMAIER: Med. Klin. **1951**, 591. — WESTERFIELD, W. W., F. J. STOTZ and R. L. BERG: J. of Biol. Chem. **144**, 657 (1942); **149**, 237 (1943). — WESTFALL, B. A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, 33 (1946); **101**, 163 (1951). — WEIL-MALHERBE, H. in: Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes, S. 54. Berlin: Springer 1952.

Dr. K. STUHLFAUTH, Medizinische Poliklinik der Universität München.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. BRÜCKE.)

Ganglionär blockierende Wirkungen von Polymethylen-bis-Phosphonium-Verbindungen.

Von

K. H. GINZEL, H. KLUPP, O. KRAUPP, G. WERNER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Oktober 1953.)

In einer früheren Mitteilung [GINZEL u. Mitarb. (1)] wurden die neuro-muskulär lähmenden Wirkungen einer Reihe von Bis-Trialkyl- bzw. Bis-Triphenylphosphoniumverbindungen beschrieben. Die meisten dieser Verbindungen zeigten an verschiedenen Testobjekten Eigenschaften, die im wesentlichen mit denen von d-Tubocurarin übereinstimmen. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über weitere Untersuchungen, die sich mit den ganglionär blockierenden Wirkungen dieser Substanzen befassen.

Tabelle 1. *Formelübersicht*

Bezeichnung	Formel
Q ₃	$[(C_2H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_4 - P \equiv (C_2H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₆	$[(C_2H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_5 - P \equiv (C_2H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₇	$[(C_2H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_6 - P \equiv (C_2H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₈	$[(C_2H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_{10} - P \equiv (C_2H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₁₀	$[(C_6H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_4 - P \equiv (C_6H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₁₁	$[(C_6H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_5 - P \equiv (C_6H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$
Q ₁₂	$[(C_6H_5)_3 \equiv P - (CH_2)_6 - P \equiv (C_6H_5)_3]^{2+} 2 Br^-$

Tab. 1 gibt einen Überblick über die von uns untersuchten Substanzen*.

Methodik.

1. *Versuche am isolierten Meerschweinchendünndarm in der Anordnung nach MAGNUS.* Zusammensetzung der Tyrodelösung: NaCl 8,0; KCl 0,2; MgCl₂ 0,025; CaCl₂ 0,2; NaH₂PO₄ 0,05; NaHCO₃ 1,0; Glucose 1,0; H₂O ad 1000,0. Untersucht wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen der Q-Substanzen auf die kontrakturlösende Wirkung von Acetylcholin (0,005—0,05 µg/cc), Nicotin (2,0 bis 3,0 µg/cc) und Histamin (in 0,005—0,05 µg/cc).

2. *Versuche an Katzen.* a) An Katzen in Chloralosenarkose (80 mg/kg/i. v.) wurden gleichzeitig die folgenden Funktionen registriert: Kontraktion des M. gastrocnemius bei indirekter Reizung, Kontraktionen der Nickhaut nach faradischer Reizung des Hals-sympathicus, Blutdruck und Spontanatmung nach GADDUM.

* Diese Substanzen wurden von der Firma Dr. K. THOMAE, Biberach/Riß synthetisiert und uns zur pharmakologischen Untersuchung übergeben.

b) An Katzen in Chloralosenarkose wurde je eine Elektrode an den N. vagus am Hals (in der Regel re.) sowie am li. N. splanchnicus angelegt, beide Nerven wahlweise tetanisch gereizt und der arterielle Blutdruck registriert. Die Versuchslösungen wurden mittels Infusionsspritze in die V. femoralis infundiert (Infusionsgeschwindigkeit 0,5—1,5 cm³/min). In einigen Versuchen wurde außerdem Tonus und Motilität des Dünndarmes nach der Methode von STRAUB u. VIAUD mitregistriert. In allen Versuchen, in denen der N. splanchnicus übermaximal gereizt wurde, blieb auch bei hohen Dosen ganglionär blockierender Stoffe [Hexamethonium (C₆) und bei Tetraäthylammonium (TEA)] ein Rest der pressorischen Wirksamkeit erhalten; andererseits gelang es, die Synapsen des Splanchnicus mit niedriger Reizschwelle schon durch verhältnismäßig kleine Dosen von Ganglienblockern auszuschalten. Diese Verhältnisse machten es notwendig, neben supra-maximalen Reizströmen auch noch Schwellenstromstärken in Bezug auf ihre pressorischen Effekte vor und unter der Einwirkung eines ganglionär blockierenden Stoffes zu prüfen.

c) Präparation des Gangl. cervicale sup. der Katze nach KIBJAKOV in der Modifikation von BRÜCKE. Die präganglionären Fasern des im Ganglion umgeschalteten Halssympathicus wurden durch Tetani rhythmisch im Abstand von 2 min für die Dauer von je 15 sec gereizt (28 pro sec. Impulsdauer 7,5 msec).

3. *Versuche an Hunden in Chloralosenarkose* (80 mg/kg i. v.). Folgende Funktionen wurden gleichzeitig registriert:

a) Speichelsekretion der Glandula submandibularis nach faradischer Reizung der Chorda tympani (Reizdauer 20 sec) durch Kanülierung des Ausführungsganges und Messung der nach Reizung aus der Kanüle austretenden Tropfenzahl.

b) Blutdrucksenkung nach faradischer Reizung des re. Halsvagus (5 sec Reizdauer).

c) Blutdrucksteigerung nach faradischer Reizung des li. N. splanchnicus (10 sec Reizdauer).

d) Registrierung der Darmperistaltik über eine in das Ileum oder Jejunum eingebundene Kanüle mittels eines Wassermanometers nach STRAUB u. VIAUD.

e) Tonus und Motilitätsveränderungen des Dünndarmes nach faradischer Reizung des distalen Vagusstumpfes im Thorax bzw. unterhalb des Zwerchfelles. Reizdauer 3—4 sec, Reizabstand 15—18 sec. Die Volumsänderungen des Darmes wurden mittels Wassermanometers registriert.

4. *Versuche am nicht narkotisierten Hund.* a) Prüfung der Ausschaltung der vagalen Gegenregulation nach der Methode von MORRISON u. HEYMANS. Die Methode beruht darauf, daß die pressorische Wirkung einer kleinen Adrenalindosis (2—4 µg/kg i. v.) nach Ausschaltung der vagalen Gegenregulation verstärkt wird. Sofern parasymphaticolytische Wirkungen der Versuchskörper auszuschließen sind, kann die Verstärkung der Adrenalinwirkung direkt als Ausdruck der Blockade vagaler Ganglien gewertet werden. Zur Blutdruckmessung punktierten wir in diesen Versuchen die Art. femoralis in Lokalanästhesie. Die Versuchslösungen injizierten wir in die V. saphena.

b) Prüfung der Magensaftsekretion an Hunden mit künstlicher Magenfistel nach PAVLOW (zit. KESTNER). Zur Auslösung der Magensaftsekretion wurden entweder 5 Einheiten Insulin i. v. oder 0,5—1,0 mg Histamin subcutan injiziert.

In den Versuchen mit Insulin wurde gleichlaufend mit der Sammlung des Magensaftes der Verlauf der Blutzuckerkurve bestimmt. 25—30 min nach der Insulininjektion setzte zugleich mit dem starken Blutzuckerabfall die Sekretion des Magensaftes ein. Diese Sekretion dauerte im Durchschnitt 2—2½ Std an und betrug etwa 100 cm³. Die Histaminsekretion trat bereits 5—10 min nach der Injektion ein und war nach etwa 1 Std beendet. Die hierbei durchschnittlich produzierte

Magensaftmenge betrug 60 cm³. Im filtrierten Magensaft wurden freie und gebundene Salzsäure titrimetrisch bestimmt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden jeweils 1 Std vor der Insulin- bzw. Histamininjektion verabreicht. Die Tiere wurden 24 Std vor dem Versuch nüchtern gehalten.

c) Untersuchung der Darmmotorik an Hunden mit künstlicher Darmfistel. Zur Druckmessung wurde ein Ballon aus Kondomgummi durch eine in den mittleren Abschnitt des Jejunums antimesenterial eingenähte Metallkanüle eingebracht. Die Registrierung erfolgte durch Luftübertragung mittels eines Wassermanometers. Zu Versuchsbeginn wurde ein Druck von 10–20 cm Wassersäule vorgegeben. Unter diesen Bedingungen konnte jedesmal eine ausgiebige Peristaltik beobachtet werden.

5. *Untersuchung auf periphere Gefäßwirksamkeit.* a) Isolierte Durchströmung der hinteren Extremität am Hund. Durch eine in die A. iliaca eingebundene Kanüle wurde bei ligierter Aorta abdominalis heparinisiertes Blut mittels einer DALE-SCHUSTER-Pumpe zugeführt. Das aus der Vene ausströmende Blut wurde mittels eines GADDUM-Recorders gemessen und über eine künstliche Lunge (System HOOKER-DRINKER) reinfundiert. Gleichzeitig mit der Messung des ausströmenden Blutvolumens wurde auch der Durchströmungsdruck registriert.

b) Durchströmung des isolierten Kaninchenohrs nach der Methode von BURN u. DUTTA.

6. *Versuche an Kaninchen in Urethannarkose* (1,0 g/kg, i.v.). An diesen Tieren wurde der Einfluß ganglionär lähmender Stoffe auf Darmonus und Mortalität nach der Methode von STRAUB u. VIAUD registriert. Gleichzeitig wurde das Verhalten des arteriellen Druckes bei Reizung des N. vagus am Hals beobachtet.

7. *Versuche an Ratten in Nembutalnarkose* (50 mg/kg, subcutan). An diesen Tieren wurde die Säureproduktion des Magens nach subcutaner Histamininjektion und deren Beeinflussbarkeit durch die Versuchspräparate geprüft. Nach Ligatur des Oesophagus wurde eine mit mehreren wandständigen Öffnungen versehene Glas-kanüle vom Pylorus aus in den Magen eingebunden. Nach einer Einzelinjektion von 10 mg Histamin/100 g (s.c.) wurde in halbstündigen Intervallen der Mageninhalt durch dreimalige Spülung mit je 2 ml körperwarmer physiol. Kochsalzlösung gewonnen und freie und gebundene Salzsäure titriert. Die Salzsäureproduktion dauerte durchschnittlich 2 Std nach der Injektion an und entsprach im Mittel 1,59 cm³ n/10 NaOH (Gesamtsäure) bzw. 1,22 cm³ n/10 NaOH (Freie Salzsäure). Zur Testung der Beeinflussung der Magensaftproduktion wurde die Versuchssubstanz ½ Std vor der Histamininjektion verabreicht.

8. *Untersuchungen der Magensaftproduktion nach Abbindung des Pylorus an Ratten* (SHAY u. Mitarb.). Die Versuche wurden in der Modifikation von RISLEY et al. durchgeführt, wobei nicht die Entstehung der Ulcera abgewartet, sondern Volumen und Acidität des Mageninhaltes nach einem Intervall von 5 Std nach Ligatur des Pylorus bestimmt wurden. Die Versuchslösungen wurden in 2 Einzeldosen je 1 Std vor und 1 Std nach der Pylorusligatur subcutan injiziert. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn 48 Std ohne Futter und Wasser belassen; am Vorabend vor dem Versuchstag wurden 3 ml physiol. Kochsalzlösung subcutan injiziert. Die Ergebnisse wurden nach dem FISHERSchen *t*-Test auf ihre Signifikanz geprüft.

Ergebnisse.

Zunächst wurden sämtliche Substanzen am Meerschweinchendünndarm vergleichend untersucht. In Tab. 2, Spalte 2, sind die Konzentrationen angegeben, die die erregende Wirkung des Nicotins auf den Darm um 70–90% des Ausgangswertes herabsetzen. In den weiteren

Spalten der Tab. 2 ist die gleichzeitig beobachtete Herabsetzung der Acetylcholin- (ACH) und der Histaminkontraktur, ausgedrückt in Prozenten der Ausgangshöhe, angeführt. Zum Vergleich wurden auch die entsprechenden Daten von C 6 bestimmt und in die Tabelle aufgenommen. Keine der Verbindungen der Q-Serie bewirkte bei Zusatz zur Badelösung eine Eigenerrregung des Darmes. Aus der Zusammenstellung geht

Tabelle 2. *Herabsetzung der kontrakturauslösenden Wirkung von Nicotin, Acetylcholin und Histamin auf den isolierten Darm des Meerschweinchens durch Bis-Phosphoniumverbindungen um Prozent der Ausgangshöhe.*
(Mittelwerte aus je 5 Einzelbestimmungen.)

Versuchskörper	Konzentration	Nicotin	Acetylcholin	Histamin
Q ₃	10 ⁻⁵	70	0	0
Q ₆	5 · 10 ⁻⁶	90	90	40
Q ₇	5 · 10 ⁻⁵	90	0	0
Q ₈	10 ⁻⁵	70	0	0
Q ₁₀	10 ⁻⁶	70	0	0
Q ₁₁	2 · 10 ⁻⁷	70	60	0
Q ₁₂	10 ⁻⁶	90	80	20
C ₆	10 ⁻⁵	90	20	0

hervor, daß die untersuchten Bisphosphoniumverbindungen in ähnlicher Weise wie Hexamethonium die erregende Wirkung des Nicotins auf den Meerschweinchendarm in wesentlich stärkerem Ausmaße als die entsprechende Wirkung von Histamin hemmten. Das bedeutet, daß zumindest für jene Substanzen, durch die die ACh-Kontraktur im Vergleich zur Nicotin-Kontraktur nur schwach beeinflußt wurde, eine vorwiegend ganglionär blockierende Wirkung anzunehmen ist (FELDBERG). Die Wirkung trat bei sämtlichen Substanzen nur langsam ein (Wirkungsmaximum nach 10 min) und war schlecht auswaschbar. Bezüglich der Wirkungsstärke konnten wir feststellen, daß die Bis-triphenylphosphoniumverbindungen die entsprechenden Trialkylphosphoniumverbindungen an Wirksamkeit übertrafen. Als wirksamste der untersuchten Substanzen erwies sich hierbei Q 11, das in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ die Nicotinkontraktur auf $\frac{1}{3}$ herabsetzte, wobei allerdings gleichzeitig eine ziemlich beträchtliche Antiacetylcholinwirkung zu beobachten war.

An Katzen (Methodik 2a) konnte festgestellt werden, daß lediglich die Substanz Q 11 eine fast vollkommene Blockade der Erregungsübertragung im Ganglion cervicale sup. verursachte, ohne daß dabei eine periphere Muskellähmung eintrat. Der Blutdruck wurde hierbei stark gesenkt. Weitere Versuche am isolierten Ganglion cervicale sup. (Methodik 2c) ergaben, daß Q 11 bereits in einer Dosis von 100 µg sowohl die chemische als auch die elektrische Erregbarkeit für etwa 15 min

vollkommen aufhob und sich dadurch auch in dieser Versuchsanordnung als wirksamste der untersuchten Bisphosphoniumverbindungen erwies.

Da Q 11 sowohl in den bisher beschriebenen als auch in den nachstehend angeführten Versuchsanordnungen hinsichtlich der Stärke seiner ganglionären Wirkungen die anderen Versuchskörper übertraf, beschränken wir uns in der Folge auf die Wiedergabe der Versuchsergebnisse mit dieser Substanz.

Um festzustellen, in welcher Reihenfolge sympathische und parasympathische Ganglien durch Q 11 ausgeschaltet werden, wurde diese Substanz an Katzen in langsamer Infusion zugeführt und Splanchnicus und Vagusreizeffekt gleichzeitig beobachtet (Methodik 2b). Bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 10–20 $\mu\text{g/kg/min}$ unterblieb nach einer Gesamtdosis von 100–200 $\mu\text{g/kg}$ Q 11 die Blutdrucksenkung nach Reizung des N. vagus, ohne daß sich der arterielle Mitteldruck veränderte. Die Empfindlichkeit gegenüber der depressorischen Wirkung von Acetylcholin blieb während der ganzen Infusionsdauer unbeeinflusst. Die Erregbarkeit des N. splanchnicus war zu diesem Zeitpunkt sowohl für Schwellen- als auch für maximale Reize noch voll erhalten. Bei höheren Gesamtdosen schwanden die Effekte der Splanchnicusreizung mit Schwellenstromstärken und bei Dosen von etwa 500 $\mu\text{g/kg}$ wurden auch die pressorischen Effekte nach maximaler Splanchnicusreizung herabgesetzt. Eine vollkommene Unterdrückung der Blutdrucksteigerung nach supramaximaler Splanchnicusreizung konnte jedoch selbst durch Dosen, die bereits die Atemmuskulatur lähmten (2–4 mg/kg), niemals erreicht werden.

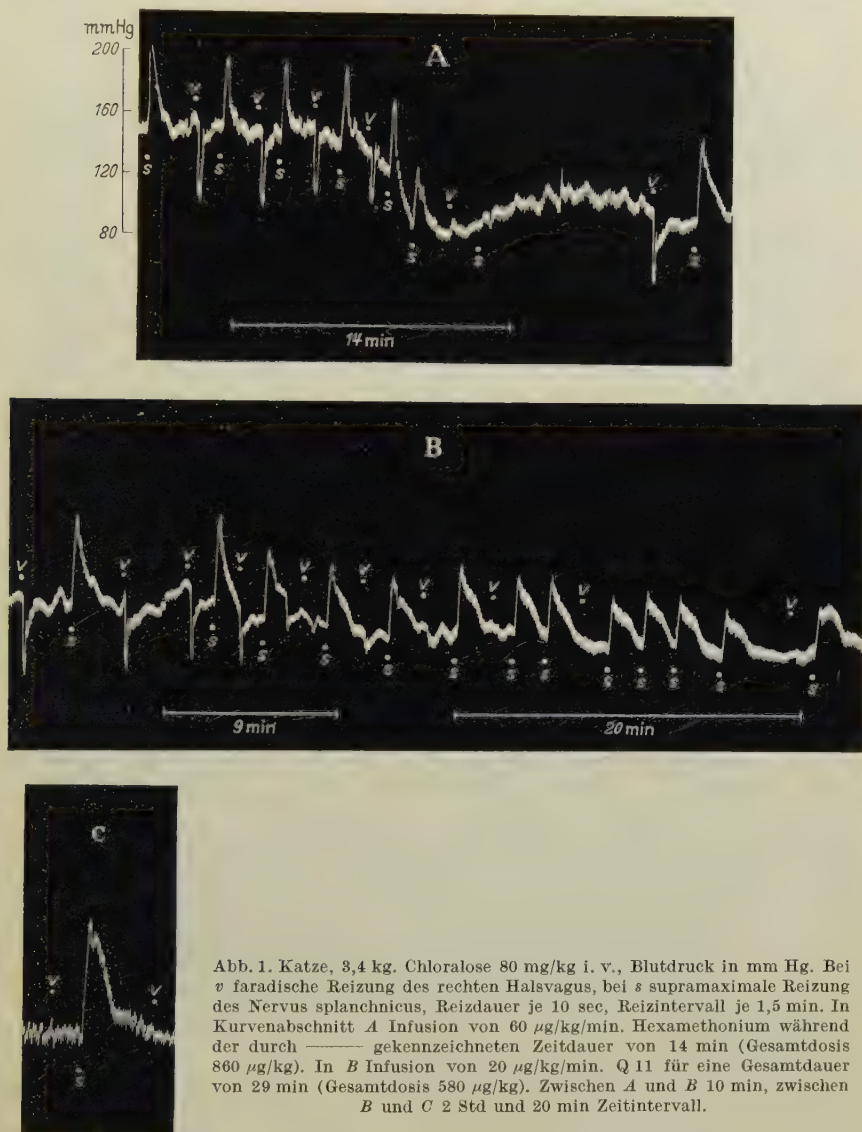
Abb. 1 gibt ein Beispiel für einen derartigen Versuch, in dem die Wirkung von Q 11 mit Hexamethonium verglichen wurde: Während Hexamethonium Vagus- und Splanchnicusreizeffekte gleichzeitig blockierte, verursachte Q 11 in einer Gesamtdosis von 580 $\mu\text{g/kg}$ nur eine Einschränkung des pressorischen Splanchnicusreizeffektes auf die Hälfte der Anfangshöhe; bereits ein Drittel dieser Dosis hatte den Vagusreizeffekt vollkommen aufgehoben. 2½ Std später war die Vagusreizung noch immer wirkungslos, die pressorische Wirkung des Splanchnicusreizes jedoch zu diesem Zeitpunkt wieder vollkommen hergestellt.

Bei allen diesen Versuchen kehrte der Vagusreizeffekt selbst nach stundenlanger Versuchsdauer niemals mehr auf seinen Ausgangswert zurück, eine partielle Wiederkehr war jedoch nach Dosen von 100 bis 200 $\mu\text{g/kg}$ Q 11 im allgemeinen nach 1–2 Std zu beobachten.

Ähnlich wie Q 11 verhielt sich auch TEA: Nach einer Gesamtdosis von 5 mg/kg (Infusionsgeschwindigkeit 1,5 mg/kg/min) war bei dieser Substanz nur eine vollkommene Aufhebung des Vagusreizeffektes zu beobachten, während die Wirkung von Splanchnicusreizen erst nach einer Gesamtdosis von 14 mg/kg eingeschränkt wurde.

Die bei intravenösen Einzeldosen zu beobachtende Blutdrucksenkung (siehe Tab. 3) trat in den Versuchen mit langsamer Infusion von Q 11

und TEA selbst bei hohen Gesamtdosen nicht in Erscheinung. Auch bei Hunden führte die langsame Infusion von Q 11 zu einer bevorzugten



Herabsetzung des Vagusreizeffektes. Bei gleichzeitiger Messung der durch elektrische Chordareizung (siehe Methodik) ausgelösten Speichelsekretion ergab sich, daß Gesamtdosen von über 150 $\mu\text{g/kg}$ Q 11 den Speichelfluß

auf etwa $\frac{1}{4}$ des Ausgangswertes herabsetzten. Diese Hemmwirkung auf die Speichelsekretion war etwa 1 Std nach der Infusion wieder voll-

Tabelle 3. Übersicht der relativen Wirksamkeit von Bis-Phosphoniumverbindungen auf die neuromuskuläre und ganglionäre Erregungsübertragung sowie den Blutdruck der Katze.

Versuchskörper	Dosis pro kg	Herabsetzung der Kontraktionen		Blutdrucksenkung um mm Hg
		des M. gastrocn. um % der Ausgangshöhe	der Nickhaut	
Q ₃	1 mg	10	0	0
	4 mg	60	20	30
Q ₆	2 mg	0	0	0
	4 mg	90	60	80
Q ₇	4 mg	100	50	30
Q ⁸	1 mg	30	40	40
Q ¹¹	1 mg	0	70	80
Q ¹³	1 mg	50	0	10

kommen abgeklungen, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Blutdrucksenkung nach Vagusreizung noch vollkommen ausblieb. Die pressorische Adrenalinwirkung wurde an wachen Hunden durch Q 11 verstärkt (Abb. 2). Dies kann ebenfalls als Hinweis auf eine Unterbrechung der

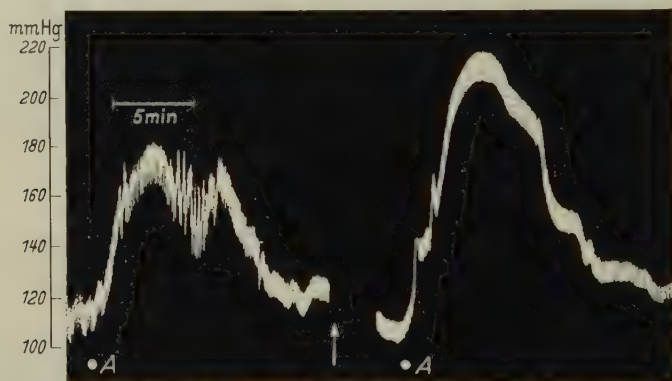


Abb. 2. Hund, 25 kg. Punktion der Arteria femoralis in Lokalanästhesie, Blutdruck in mm Hg. Bei 3 µg/kg Adrenalin i. v., der Pfeil markiert die i. v. Injektion von 200 µg/kg Q 11.

im Vagus verlaufenden efferenten Impulse durch Q 11 gewertet werden (MORRISON u. HEYMANS).

An der isoliert durchströmten Hinterextremität des Hundes beeinflußte Q 11 auch in hohen Dosen den Gefäßtonus nicht. Auch an diesem Präparat war kein Antagonismus gegenüber der Gefäßwirkung von ACh zu beobachten. Am isoliert durchströmten Kaninchenohr blockierte Q 11

die durch Nicotin ausgelöste Vasokonstriktion bereits in Dosen von $20\text{ }\mu\text{g}$, wobei die gefäßverengende Wirkung von Adrenalin unbeeinflusst blieb. 10fach höhere Dosen von Q 11 verursachten bereits selbst eine geringgradige Vasokonstriktion und hoben neben der Nicotinwirkung auch

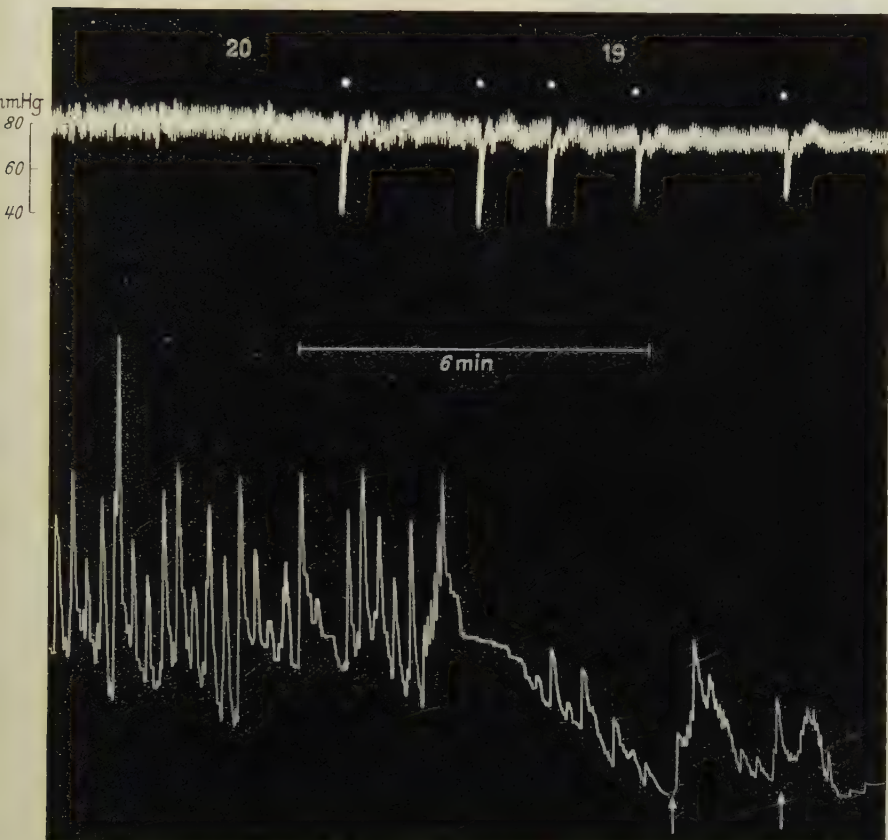


Abb. 3. Hund, 12 kg, Chloralose 80 mg/kg i. v., oben Blutdruck in mm Hg; die weißen Punkte zeigen die Reizung des re. Halsvagus an, die darüberstehenden Zahlen bezeichnen die Tropfenzahl der Speichelsekretion bei Reizung der Chorda tympani (Reizdauer: 20 sec). Untere Kurve: Darmperistaltik ausgelöst durch faradische Reizung des re. intrathorakalen Vagusstammes (unterhalb des Abganges der Herzfasern) alle 18 sec für je 4 sec Dauer. Künstliche Atmung: die weiße Linie zeigt die Dauer der Infusion von $10\text{ }\mu\text{g/kg/min}$ Q 11 (Gesamtdosis $60\text{ }\mu\text{g/kg}$) an. Bei den Pfeilen wurden 10 bzw. 5 ml RINGER-Lösung in den Darm eingefüllt; erst 45 min später trat wieder eine Peristaltik auf.

noch die Adrenalinwirkung auf. Nach KOTTEGODA ist die Aufhebung der Nikotinwirkung am Kaninchenohr ein Kennzeichen für ganglienblockierende Stoffe (z. B. C 6 und TEA). Bei einem Vergleich mit C 6 erwies sich Q 11 als 5mal wirksamer. Bei der Prüfung der Beeinflussung der Darmmotorik der narkotisierten Katze zeigte Q 11 in Dosen bis zu

600 $\mu\text{g/kg}$ nur eine schwache darmlähmende Wirkung. C 6 dagegen wirkt an diesem Versuchsobjekt stark motorisch erregend, da es den bei



Abb. 4. Darmfistelhund, 21 kg, Registrierung von Tonus und Darmperistaltik einer mittleren Jejunumschlinge; bei 1 intravenöse Injektion von 250 $\mu\text{g/kg}$ Q 11, bei 2 von 5 $\mu\text{g/kg}$ Carbaminoylcholinchlorid. An den durch Punkte bezeichneten Stellen Unruhebewegungen mit tiefen Atemzügen.

Katzen überwiegenden sympathischen Hemmtonus des Darmes beseitigt [PATON u. ZAIMIS, (2)]. Am Kaninchendarm in situ verursachte Q 11 ebenso wie C 6 eine Steigerung des Tonus wie auch der Peristaltik. Die hierzu notwendigen Dosen (50 $\mu\text{g/kg}$ Q 11 bzw. 100–200 $\mu\text{g/kg}$ C 6) reduzierten den blutdrucksenkenden Effekt der Halsvagusreizung bereits auf die Hälfte.

An Hunden in Chloralosenarkose wurde der Effekt von Q 11 auf die Steigerung der Darmmotorik bei intrathorakaler bzw. intraabdomineller Vagusreizung festgestellt (Versuchsanordnung 3c). Bei intravenöser Infusion von Q 11 (10–20 $\mu\text{g/kg/min}$) zeigte sich bereits bei einer Gesamtdosis von 30–60 $\mu\text{g/kg}$, daß die motorischen Effekte der Vagusreizung auf den Darm ausblieben und daß der Ruhetonus des Darmes stark absank (Abb. 3). Bei höheren Dosen von Q 11 war die Tonusabnahme so bedeutend, daß ein vielfaches der anfänglich im Darm enthaltenen RINGER-Lösung nachgefüllt werden konnte, ohne daß der Innendruck, gemessen am Wassermanometerstand, anstieg.

An nicht narkotisierten Hunden mit Dünndarmfisteln bewirkte Q 11 in Dosen bis zu 100 $\mu\text{g/kg}$ keine Änderung der spontanen Darmperistaltik; bei Einzelinjektion von mehr als 200 $\mu\text{g/kg}$ war eine deutliche Peristaltikhemmung nachzuweisen, die jedoch durch Carbaminoylcholin zu durchbrechen war (Abb. 4).

Die Wirkung von Q 11 auf die Magensaftsekretion wurde zunächst an Ratten in der unter Methodik 8 angegebenen Versuchsanordnung überprüft.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 4.

	Mittelwert aus 100 Kontrolltieren	Mittelwert aus 36 Tieren mit insgesamt 10 mg/kg Q 11
In 5 Std produzierter Magensaft: in cm ³	4,27 (S. E. 0.4)	1,5 (S. E. 0.3)
In 5 Std produzierte Gesamtsalzsäure: in cm ³ (n/10HCl)	2,32 (S. E. 0.4)	0,61 (S. E. 0.33)
Gesamtacidität: in cm ³ (n/10 NaOH pro 100 cm ³ : Magensaft)	54,44	40,7

Sämtliche Werte der Tab. 4 beziehen sich auf 100 g Tiergewicht. Die Q 11-Dosis wurde in 2 Injektionen zu 5 mg je 1 Std vor und 1 Std nach der Pylorusligatur verabreicht.

Ein Vergleich der Werte in Tab. 4 ergibt, daß Q 11 Sekretionsvolumen und produzierte Säuremenge signifikant herabsetzte (Wahrscheinlichkeit 99,9%). Die geringfügige Verminderung der Acidität durch Q 11 ist jedoch statistisch nicht gesichert. Kleinere Dosen als die in Tab. 4 angegebenen führten zu keiner eindeutigen und statistisch zu sichernden Herabsetzung der Magensaft- bzw. Magensäureproduktion.

Die durch Histamin eingeleitete Magensaftsekretion wurde an Ratten in Nembutalnarkose durch Q 11 (bis zu 10 mg/kg subcutan) nicht beeinflusst; sowohl der zeitliche Ablauf der Magensaftsekretion als auch Volumen und Acidität des abgeschiedenen Magensaftes konnten nicht mit Sicherheit als verändert betrachtet werden.

Auf Grund der Ergebnisse der Rattenversuche wurden weitere Versuche über die Beeinflussung der Magensaftsekretion durch Q 11 an 5 Magenfistelhunden durchgeführt (siehe Methodik). Wenn Q 11 1 Std vor der Insulininjektion in einer Dosis von 25 µg/kg intravenös verabreicht wurde, kam es sowohl zu einer Herabsetzung des Volumens als auch der Acidität des Magensaftes auf etwa $\frac{1}{3}$ der Kontrollwerte. Bei Erhöhung der Dosis auf 100 µg/kg Q 11 und darüber wurde jedoch keine zusätzliche Verstärkung der Wirkung mehr beobachtet. Sofern zu Versuchsbeginn eine Nüchternsekretion vorhanden war, wurde sie durch Q 11 nicht beeinflusst.

Zur Prüfung einer eventuellen Wirkung von Q 11 auf die blutzuckersenkende Wirkung des Insulins wurde die Blutzuckerkurve nach Glucosebelastung (sowohl intravenös als auch peroral) an normalen und mit Q 11 vorbehandelten Tieren untersucht. Die Versuche wurden in 2 Serien durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß von Q 11 auf die Blutzuckerkurve unter Glucosebelastung allein untersucht, in der 2. Versuchsreihe noch zusätzlich Insulin verabreicht und die Wirkung auf die durch Insulin hervorgerufene Blutzuckersenkung studiert. In beiden Versuchsserien war kein Einfluß von Q 11 auf die Blutzuckerkurve nachweisbar. Gleichzeitig durchgeführte flammenphotometrische

Analysen der Serumkaliumkonzentration ergaben, daß die auf die Insulininjektion folgende Abnahme des Blutkaliums (SOMOGYI u. VERZAR) durch Q 11 nicht beeinflußt wurde. Diese negativen Befunde an der Blutzuckerkurve stehen im Gegensatz zur Wirkung von C 6, für das LAWRENCE u. STACEY eine Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung von Insulin feststellen konnten.

Auffallend war, daß die Hemmung der durch Insulin ausgelösten Magensaftsekretion nach den erwähnten Dosen von Q 11 in den einzelnen Versuchen 7—25 Tage lang andauerte und die Ausgangswerte für Volumen und Acidität des Magensaftes im Verlauf dieser Zeitspanne erst allmählich wieder erreicht wurden. Bei oraler Applikation von Q 11 erwies sich erst eine Dosis von 5 mg/kg als wirksam. 24 Std nach Verabreichung dieser Dosis war die Magensaftsekretion auf die Hälfte herabgesetzt. Diese Herabsetzung dauerte in manchen Fällen länger als 1 Woche an.

Auch in den Hundeversuchen konnte keine Verminderung der durch Histamin hervorgerufenen Magensaftsekretion beobachtet werden. Eine zum Vergleich durchgeführte Untersuchung der Atropinwirkung auf die Magensaftsekretion nach Insulin ergab, daß diese Substanz in Dosen von 3—4 $\mu\text{g/kg}$ i.v. die Magensaftsekretion auf $\frac{1}{3}$ herabsetzte. 10 $\mu\text{g/kg}$ führten zu einer völligen Unterdrückung der durch Insulin ausgelösten Magensaftsekretion. Die Wirkung von Atropin war nach 24 Std stets wieder abgeklungen. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben (KEETON u. Mitarb. und OBERHELMAN u. DRAGSTEDT) waren zu einer Herabsetzung der Magensaftsekretion durch Histamin höhere Dosen von Atropin notwendig. (50 $\mu\text{g/kg}$ Atropin reduzierten die Magensaftsekretion nach Histamin auf $\frac{1}{5}$).

Wir prüften ferner an Fistelhunden, ob Q 11 die Ausscheidung von Neutralrot durch die Magenschleimhaut beeinflußt (GLÄSSNER u. Mitarb.). Zu diesem Zwecke wurden 5—10 mg/kg Neutralrot in 40—60 ml RINGER-Lösung i.v. injiziert und die durch 1 mg Histamin ausgelöste Abscheidung des Farbstoffes in den Magensaft colorimetrisch bestimmt. Im Mittel wurden 4,0% des verabreichten Neutralrotes innerhalb 1 Std nach der Histamininjektion ausgeschieden. Q 11 veränderte in Dosen bis zu 250 $\mu\text{g/kg}$ diese Ausscheidung nicht. Der Einfluß von Q 11 auf die Neutralrotausscheidung im Magensaft nach Insulinverabreichung konnte nicht untersucht werden, da eigenartigerweise Neutralrot selbst in den verwendeten Dosen zu einer lang dauernden Hemmung der „Insulinsekretion“ führte.

Besprechung der Ergebnisse.

Auf Grund der in der Literatur vorliegenden Untersuchungen [GINZEL u. Mitarb. (3) und RANDALL] zeichnet sich eine Beziehung ab, wonach Ersatz von Methyl- durch Äthylgruppen an Stickstoffatomen von quartären Ammoniumverbindungen zum Auftreten curareartig lähmender bzw. ganglienblockierender Wirkungen führt [GINZEL u. Mitarb. (2)].

Ähnliche Beziehungen ergeben sich auf Grund der vorliegenden Untersuchungen und der vorausgegangenen Mitteilung [GINZEL u. Mitarb. (1)] (Vergleiche Q 152, Q 153) für Bisphosphoniumverbindungen: Hinsichtlich des Einflusses der Länge der Polymethylenkette auf die Wirkungs-

weise bestehen bei den Bisphosphoniumverbindungen ähnliche Zusammenhänge wie für quartäre Polymethylen-bis-Trimethyl-Ammoniumverbindungen [PATON u. ZAIMIS (1)]. So z. B. wurde in der vorangegangenen Mitteilung [GINZEL u. Mitarb. (1)] die Dekamethylen-bis-Triphenylphosphoniumverbindung (Q 13) als die am stärksten neuromuskulär lähmende Verbindung der vorliegenden Reihe befunden, während nach den hier mitgeteilten Ergebnissen ein stärkeres Hervortreten ganglionär blockierender Wirkungen für die entsprechende Pentamethylen-bis-triphenylphosphoniumverbindung (Q 11) beobachtet werden konnte. Die ganglienblockierende Wirkung von Q 11 zeichnete sich durch das Hervortreten der Blockade vagaler Ganglien aus. Dies konnten wir vor allem an der Reihenfolge feststellen, in der bei langsamer intravenöser Invasion von Q 11 die Reizeffekte des N. vagus und des N. splanchnicus ausgeschaltet wurden. Die relative Unempfindlichkeit der Synapsen des Sympathicus gegenüber Q 11 kann auch zur Erklärung des Befundes herangezogen werden, daß Q 11 bei intravenöser Infusion keine nennenswerte blutdrucksenkende Wirkung zeigte, während z. B. C 6 unter gleichen Bedingungen immer zu einer Blutdrucksenkung unter gleichzeitiger Lähmung der parasympathischen und sympathischen Ganglien führte. Hingegen zeigte TEA ein ähnliches Verhalten wie Q 11, da es ebenso wie dieses bei kontinuierlicher Infusion Vagusreizeffekte relativ stärker blockierte.

Die ganglienblockierende Wirkung von Q 11 trat auch in der Hemmung der durch elektrische oder reflektorische Vaguserregung hervorgerufenen Sekretionsvorgänge (Chorda tympani Reizung und Magensaftsekretion nach Insulin) in Erscheinung. Im Falle der durch Insulin hervorgerufenen Magensaftsekretion (DOBREFF; LA BARRE u. CESPEDES) handelt es sich offenbar um eine durch die Erniedrigung des Blutzuckerspiegels ausgelöste Erregung des Vaguskerne. Da wir nachweisen konnten, daß die Wirkung von Insulin auf den Blutzuckerspiegel durch Q 11 nicht beeinflußt wurde und Q 11 am Ganztier keinerlei atropinartige Wirkungen aufwies, beruhte die Hemmung der durch Insulin hervorgerufenen Magensaftsekretion durch Q 11 offenbar auf einer Blockierung vagaler Ganglien. Zum Unterschied von TEA (NELIGH u. Mitarb.) und auch von Atropin wurde die Insulinsekretion durch Q 11 in keinem Dosenbereich vollkommen unterdrückt, sondern lediglich auf einen Grenzwert von $\frac{1}{3}$ der Norm reduziert; auch wurde weder die Nüchternsekretion noch die durch Histamin ausgelöste Sekretion in den von uns verwendeten Dosen von Q 11 ausgeschaltet.

Eine merkwürdige Abweichung des Wirkungsbildes von Q 11 gegenüber jenem von bekannten ganglienblockierenden Substanzen wie TEA oder C 6 trat in den Versuchen an wachen Kaninchen in Erscheinung: an diesen Tieren bewirkte Lobelin sowie andere Stoffe mit nicotinartigen Eigenschaften (z. B. der Sebacinsäure-bis-cholinester) einen kurzdauernden

Atemstillstand, der durch Vorbehandlung der Tiere mit C 6 oder TEA verhindert werden konnte [GINZEL u. Mitarb. (4)]. Q 11 dagegen beseitigt diesen Atemstillstand nicht.

Auch am in situ belassenen Katzendünndarm zeigte Q 11 eine von C 6 abweichende Wirkung. An diesem Präparat wirkt C 6 erregend, da es bei dieser Tierart den besonders ausgeprägten sympathischen Hemmtonus des Darmes beseitigt [PATON u. ZAIMIS (2)]. Q 11 hingegen regte die Darmmotorik nicht an, sondern bewirkte eine schwache Lähmung. TEA verhielt sich in dieser Versuchsanordnung wie C 6. Hingegen wirkten am Kaninchen Darm in situ Q 11 und C 6 in etwa der gleichen Weise tonussteigernd.

Zusammenfassung.

Unter den hier untersuchten Bis-Trialkyl- bzw. Triphenyl-Polymethylen-bis-phosphoniumverbindungen zeigte das Pentamethylen-bis-phenyl-Phosphoniumbromid (Q 11) die stärksten ganglionär blockierenden Eigenschaften. Diese ganglionäre Hemmwirkung war besonders gegenüber vagalen Ganglien ausgeprägt, während die Tätigkeit sympathischer Ganglien erst durch viel höhere Dosen eingeschränkt wurde. TEA verhielt sich in dieser Hinsicht ähnlich wie Q 11, während C 6 in den von uns verwendeten Versuchsanordnungen sympathische und parasympathische Ganglien in gleicher Weise ausschaltete. Die durch vagale Erregungsübermittlung hervorgerufenen Sekretionsvorgänge (Magensaftsekretion nach Insulin, Speichelsekretion nach Chordareizung) wurden durch Q 11 weitgehend eingeschränkt. Die Magensaftsekretionseinschränkung dauert in einigen Versuchen bis zu 10 Tagen an. Am Dünndarm wurde die Peristaltik nach Vagusreizung sowie die Spontanrhythmik durch höhere Dosen von Q 11 weitgehend ausgeschaltet. Der Verlauf der Blutzuckerkurve unter Glucose bzw. Glucose-Insulinbelastung wurde durch Q 11 nicht beeinflusst.

Für die Demonstration der PAVLOV'schen Operationsmethode zum Anlegen von Magen- und Darmfisteln sind wir weiland Herrn Prof. Dr. C. SCHWARZ-WENDL zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

BAYLISS, W. M., E. H. STARLING: *J. of Physiol.* **26**, 125 (1900). — BURN, J. H., H. K. DUTTA: *Brit. J. Pharmacol.* **3**, 354 (1948). — BRÜCKE, F., W. MACHO, G. WERNER: *Wien. klin. Wschr.* **1948**, 1. — DOBREFF, M.: *Arch. Verdauungs-Krankh.* **50**, 157 (1951). — FELDBERG, W.: *J. of Physiol.* **113**, 483 (1951). — GADDUM, J. H.: *J. of Physiol.* **99**, 257 (1941). — GILMAN, T. A.: *Gastroenterology* **3**, 188 (1944). — GINZEL, K. H., H. KLUPP, O. KRAUPP, G. WERNER: (1) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **217**, 173 (1953). — (2) *Vortr. Tag. Öst. Anaesthesiol. Ges.* 1953, Velden. — GINZEL, K. H., H. KLUPP, G. WERNER: (3) *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **215**, 103 (1952). — (4) *Arch. internat. Pharmacodynamie* **89**, 160 (1952). — (5) *Arch. internat. Pharmacodynamie* **86**, 385 (1951). — GLÄSSNER, K., H. WITTGENSTEIN, H. HAMPERL: *Arch. Verdauungs-Krankh.* **34**, 303 (1925). —

KEETON, R. W., A. B. LUCKARDT, F. C. LUCKHARDT, F. C. KOCH: *J. of Phys.* **51**, 469 (1920). — KESTNER, O.: *Handbuch d. Biol. Arbeitsmethoden* Abtg. IV, 6. Teil, S. 1065. — KOTTEGODA, S. R.: *Brit. J. Pharmacol.* **8**, 156 (1953). — LA BARRE, J., C. CESPEDAS: *C. r. Soc. Biol. Paris* **106**, 1249 (1931). — LAWRENCE, D. R., R. S. STACEY: *Brit. J. Pharmacol.* **7**, 255 (1952). — MORRISON, J. L., C. HEYMANS, A. P. RICHARDSON, H. A. WALKER: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **86**, 203 (1951). — NELIGH, R. B., J. F. HOLT, R. H. LYONS, S. W. JOOBLE u. G. K. MOC.: *Gastroenterology* (Basel) **12**, 275—289 (1949). — OBERHELMAN, H. A., L. R. DRAGSTEDT: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **67**, 336 (1942). — PATON, W. D. M., E. J. ZAIMIS: (1) *Brit. J. Pharmacol.* **4**, 381 (1949). — (2) *Brit. J. Pharmacol.* **6**, 155 (1951). — RANDALL, L. O.: *J. of Pharmacol.* **105**, 7 (1952). — RISLEY, E. A., W. B. RAYMOND, R. H. BARNES: *Amer. J. Physiol.* **150**, 754 (1947). — SHAY, H., S. A. KOMAROV, S. S. FELS, D. MERANZE, M. GRUENSTEIN: *Gastroenterology* **5**, 43 (1945). — SOMOGYI, J. C., u. F. VERZAR: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **XI**, 221 (1941). — STRAUB, W., P. VIAUD: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **169**, 1 (1933).

Dr. K. H. GINZEL, Pharmakolog. Institut d. Univ. Wien/Österreich.

Aus der Inneren Abteilung des Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhauses, Berlin
(Chefarzt: Prof. Dr. Dr. H. HORSTERS).

Experimentelle Untersuchungen über einen Penicillinester mit besonderer Leber-Gallen-Affinität.

Von

HERMANN KIPPING.

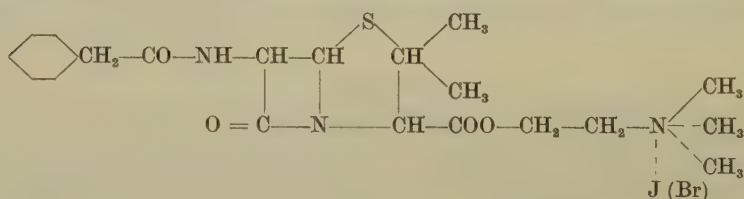
Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. November 1953.)

Durch K. A. JENSEN⁸ wurde der Penicillin-Diäthylaminoäthanol-ester in die Therapie eingeführt. Über die Anreicherung dieses Präparates in der Lunge, im Bronchialsystem und im ZNS liegen zahlreiche experimentelle Untersuchungen vor. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden bei der Behandlung pulmonaler Infektionen mit penicillinempfindlichen Erregern ausgezeichnete klinische Erfolge erzielt^{1-3, 9, 12-14}. Es lag nun nahe, das gleiche Prinzip auch auf andere Organe zu übertragen.

Angeregt durch die umfangreichen Untersuchungen von HORSTERS⁵⁻⁷ über die Physiologie und Pathologie der Galle haben wir uns vor allem mit der Beziehung der Antibiotika zum Leber-Galle-System befaßt^{10, 11}. Es zeigte sich dabei, daß die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Chloramphenicol schon kurz nach der Verabreichung in der Galle nachgewiesen werden können, und daß der Spiegel, im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren, über einen längeren Zeitraum bestehen bleibt. Zusätzliche Injektionen von dehydrocholsaurem Natrium steigerten die Anreicherung in der Galle erheblich.

Bei der Suche nach gallengängigen antibiotisch wirksamen Substanzen wurde uns der Cholinester des Penicillins zur Verfügung gestellt.



Dieser basischer Ester lag als Jodid (C 48) und Bromid (C 52) vor*. Über seine chemischen, pharmakologischen und mikrobiologischen Eigenschaften wird an anderer Stelle berichtet.

* Die neu entwickelten Präparate stellte uns freundlicherweise die Firma „Chemie Grünenthal“ zur Verfügung.

Je 250 000 IE wurden in 2 ml Aqua bidest. gelöst; als Vergleichspräparat diente Penicillin-G-Natrium in der gleich wirksamen Dosierung.

Methode.

1. Die einzelnen Galle-Proben wurden bei Pat. entnommen, bei denen im Anschluß an die Operation (Chirurg. Abtlg. des Rudolf Virchow-Krankenhauses, Chefarzt Doz. Dr. HEIM) eine Gallenfistel angelegt worden war. Die täglich abge sonderte Gallenmenge schwankte zwischen 300 und 450 ml.

2. Vor jeder Injektion der Präparate erfolgte eine Überprüfung der Gallen auf ihre mögliche biologische Eigenaktivität. Im Anschluß an die i. m. Injektion wurde in stündlichem Abstand 1—4 Std lang je eine Gallen-Probe entnommen und auf ihren Gesamt-Penicillingehalt untersucht.

3. Die biologischen Penicillin-Bestimmungen, die wir im Robert-Koch-Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten* durchgeführt haben, erfolgten im Agar-Lochtest. Voraussetzung für exakte Ergebnisse sind absolut plangeschliffene Petri-schalen, gleiche Agarmenge, -charge und -schichtdicke, gleiche Bakterieneinsaat und gleichzeitiges Mitführen einer Standardreihe auf jeder Platte. Als Testkeim diente der Staph.-Stamm SG 511. Zur Ausbildung scharf begrenzter Hemmhöfe hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Galle vor der Testung zu filtrieren. Über die Bildung des wirksamen Penicillins aus dem Ester während der Testung vgl. Methode unten S. 352.

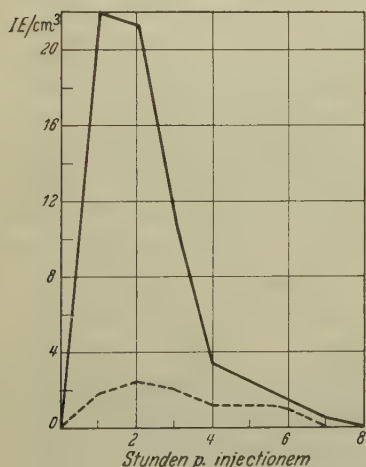


Abb. 1.

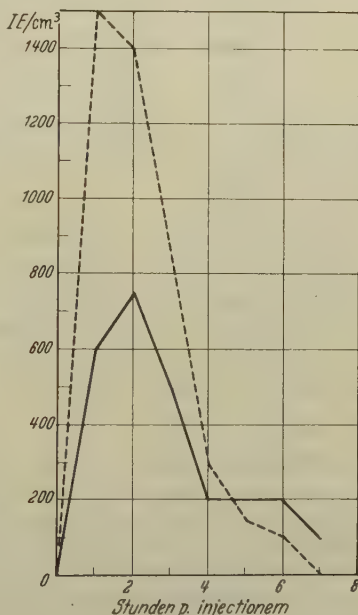


Abb. 2.

Abb. 1. Penicillin-Spiegel in der Galle. ——— Gesamt-Pen. n. i.m. Inj. von 250 000 IE C 48; ----- nach Inj. von 250 000 IE Pen-G-Na. Zahl der Patienten: 9.

Abb. 2. Penicillin-Spiegel im Urin. ——— nach i. m. Inj. von 250 000 IE C 48; ----- nach i. m. Inj. von 250 000 IE Pen-G-Na. Zahl der Patienten: 2.

* Herrn Prof. Dr. HENNEBERG sei an dieser Stelle für die freundliche Unterstützung herzlichst gedankt.

Ergebnisse.

In Abb. 1 sind die Gesamt-Penicillin-Werte nach Injektion von 250 000 IE C 48 den Konzentrationen nach Injektion der entsprechenden Menge Penicillin-G-Natrium gegenübergestellt. Jeder Patient erhielt je eine Injektion Penicillin-G-Natrium bzw. C 48. Die Kurvenpunkte stellen Durchschnittswerte dar. Sie sind aus je 9 Bestimmungen errechnet. Wie aus der Kurve zu erkennen ist, wird in den ersten beiden Stunden nach C 48 ein mehr als 10mal höherer Penicillinspiegel erreicht als nach Penicillin-G-Natrium. Von der dritten Stunde ab fallen die Werte langsam ab und erreichen nach etwa 8 Std den therapeutischen Mindestspiegel. Die Verhältnisse im Urin liegen erwartungsgemäß umgekehrt:

Bei Penicillin-G-Natrium lagen in den ersten Stunden die Penicillinkonzentrationen im Urin etwa doppelt so hoch wie nach C 48.

Bei 3 Patienten wurden die Gallenspiegel nach C 48 (also einer quaternären Base) mit den Werten nach dem Diäthylaminoäthanolester (also einer tertiären Base, als Hydrojodid = „Pulmo 500“) verglichen. Wie zu ersehen, schneidet „Pulmo 500“ ungünstiger als C 48 ab.

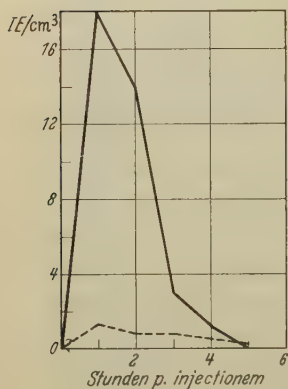


Abb. 3. Penicillin-Spiegel in der Galle. — i. m. Inj. von 250 000 IE C 48; --- nach i. m. Inj. von 250 000 IE Pulmo 500. Zahl der Pat.: 3.

In den bisher beschriebenen Untersuchungen wurde nur der Gesamt-Penicillingehalt erfaßt, nicht jedoch der für die Therapie ausschlaggebende Anteil an biologisch aktivem Penicillin. Die Trennung und Differenzierung, die von HALLAS-MØLLER⁴ für den Penicillin-Diäthylaminoäthylester beschrieben wurde, mußte deshalb auch bei dem Cholinester durchgeführt werden.

Methode.

Die aus der Gallenfistel gewonnene Galle wird mit n-Phosphorsäure auf p_H 6 eingestellt und auf $+2^\circ C$ abgekühlt. 3 ml werden in einen vorgekühlten Scheidetrichter gegeben, die gleiche Menge eiskühler, wassergesättigter Äther hinzugefügt, mit n-Phosphorsäure unter ständiger Kühlung auf p_H 1,7—2,2 eingestellt und 2 min geschüttelt. Nach Trennung der beiden Phasen, die etwa nach 2 min eingetreten ist, wird die Wasserphase in ein gekühltes Röhrchen übertragen und mit n-Natronlauge auf p_H 7,2 gebracht. Diese Fraktion, die den intakten Ester enthält, wird nach der Plattenmethode auf ihren Penicillin-Gehalt untersucht. Dies ist möglich, weil nach den Untersuchungen von HALLAS-MØLLER die Penicillinester bei p_H 7 und $37^\circ C$ im Laufe von Stunden verseift werden. — Der im Scheidetrichter zurückgebliebene Äther wird fraktioniert mit Phosphatpuffer (p_H 7,2) 3mal ausgeschüttelt, die 3 Fraktionen zusammengegeben und das darin enthaltene freie Penicillin biologisch bestimmt.

Der Durchschnittskurve der Abb. 4 liegen Werte von 4 Patienten zugrunde. Wie zu ersehen ist, macht in den beiden ersten Stunden der freie

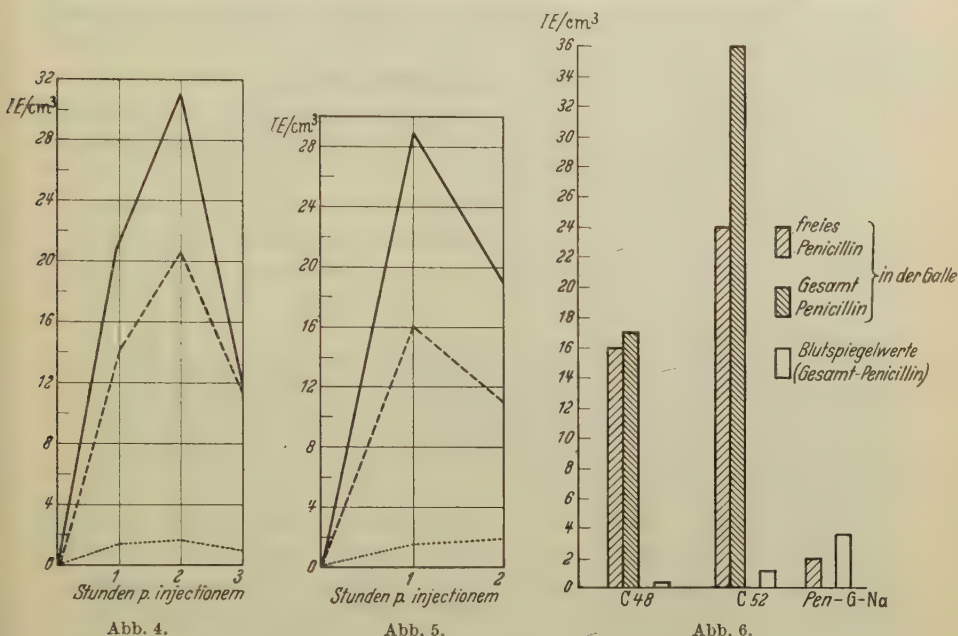


Abb. 4. Penicillin-Spiegel in der Galle nach i. m. Inj. von 250 000 IE C 48. — — — freies Penicillin; ——— Gesamt-Penicillin; - - - - - nach i. m. Inj. von 250 000 IE Pen-G-Na. Zahl der Patienten: 4.

Abb. 5. Penicillinspiegel in der Galle nach i. m. Inj. von 250 000 IE C 52 bzw. Penicillin-C-Natrium. ——— Gesamt-Penicillin; - - - — freies Penicillin; - - - - - Penicillin-G-Natrium. Zahl der Patienten: 2.

Abb. 6. Penicillinspiegel im Blut und in der Galle nach i. m. Inj. von je 250 000 IE C 48, C 52 und Penicillin-G-Natrium, 1 Std. nach Injektion. Zahl der Patienten: 2.

biologisch aktive Penicillinanteil etwa 70% des Gesamtpenicillins aus, 3 Std. nach der Injektion beträgt der Gehalt an aktivem Penicillin 94% des Gesamtpenicillins. Der Vergleich zwischen dem therapeutisch in Rechnung zu setzenden Penicillin in der Galle nach C 48 mit den Werten nach Penicillin-G-Natrium läßt eine etwa 10fache Steigerung erkennen.

Der als Bromid vorliegende Penicillinester des Cholins (C 52) zeigt praktisch gleich hohe Penicillinwerte in der Galle wie C 48.

In Abb. 6 sind die Blut- und Gallespiegel nach C 48, C 52 und Penicillin-G-Natrium wiedergegeben. Die unterschiedlichen Höhen der Konzentrationen an freiem Penicillin (Säulen mit waagerechter Schraffierung) bei C 48 bzw. C 52 einerseits und Penicillin-G-Natrium andererseits lassen mit einem Blick die ausgesprochene Affinität dieser Stoffe zur Galle erkennen.

Zusammenfassung.

Es wird über experimentelle Untersuchungen mit dem Cholinester des Penicillins berichtet. Die einzelnen Versuche wurden an Patienten durchgeführt, bei denen aus verschiedenen Gründen operativ eine Gallenfistel angelegt worden war. Die Untersuchungen zeigten:

1. 1 Std nach Injektion von 250 000 IE des Jodids oder Bromids werden in der Fistelgalle Spitzenwerte von etwa 22 Einheiten/cm³ Gesamtpenicillin erreicht.

2. Der Anteil an biologisch aktivem Penicillin liegt in den ersten beiden Stunden bei etwa 66% und steigt in der dritten Stunde auf 94% des Gesamtpenicillins. Der Spiegel an therapeutisch wirksamem Penicillin liegt nach den Cholinestern damit rund 10mal höher als nach Gabe von Penicillin-G-Natrium.

3. Während bei Penicillin-G-Natrium im Blut höhere Penicillinwerte als in der Galle gefunden werden, sind die Verhältnisse bei den Cholinestern umgekehrt. Die Konzentrationen in der Galle lassen sich so nicht durch eine besondere Diffusionfähigkeit erklären, sondern müssen als spezifisch angesehen werden.

4. Die bisher beschriebenen Untersuchungen lassen erwarten, daß man mit dem Cholinester des Penicillins wirksam in das Gebiet der infektiösen Gallenerkrankungen eingreifen kann. Nebenerscheinungen wurden nach Injektionen reinen Jodids oder Bromids nicht beobachtet.

Literatur.

- ¹ BARACH, A. L.: J. Amer. Med. Assoc. **147**, 730—737 (1951). — ² BARACH, A. L. u. a.: Dis. Chest. **23**, 121—135 (1953). — ³ DULFANO, M., u. a.: Dis. Chest. **23**, 136—142 (1953). — ⁴ HALLAS-MØLLER, K., u. a.: Ugeskr. Laeg. **1952**, 447. — Antibiotics a. Chemotherapy Vol. II, 334 (1952). — ⁵ HORSTERS, H.: Asher-Spiro, Erg. Physiol. **34**, 226 (1932). — ⁶ HORSTERS, H., u. TH. BRUGSCH: Z. exper. Med. **43**, 516 (1924); **43**, 716 (1924); **38**, 367 (1923). — Klin. Wschr. **1923**, 33. — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **124**, 3/4 (1927). — ⁷ HORSTERS, H., u. S. RUST: Klin. Wschr. **1951**, 565—569. — ⁸ JENSEN, K. A.: Ugeskr. Laeg. **1951**, 1035. — ⁹ JENSEN, K. A., P. J. DRAGSTED, I. KIAER, E. J. NIELSEN u. E. FREDERIKSEN: Ugeskr. Laeg. **1951**, 1035—1039. — ¹⁰ KIPPING, H., u. TH. SCHACKOW: Dtsch. Arch. klin. Med. **199**, 251—255 (1952). — ¹¹ KIPPING, H., u. H. SCHMOLDT: Ärztl. Wschr. **1952**, 10. — ¹² NIELSEN, J. C.: Ugeskr. Laeg. **1951**, 1049—1075. — ¹³ PAETIAELAE, J., u. R. SAVOLAINEN: Ann. med. int. fenn. **40**, 281—294 (1951). — ¹⁴ RECKNAGEL, K., K. SCHÖPF u. U. REINHOLD: Medizinische **25**, 854 (1953).

Dr. HERMANN KIPPING,

Innere Abteilung des Städt. Rudolf Virchow-Krankenhauses Berlin.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. U. EBBECKE).

Die Wirkung von Adrenalin auf die Schweißsekretion des Menschen bei elektrophoretischer Applikation.

Von

H. J. ENGELS.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. November 1953.)

Die Wirkung von Adrenalin auf die Schweißsekretion beim Menschen wurde seit seinem Bekanntwerden öfters untersucht, dabei gelangte man zu der noch heute gültigen Auffassung, daß die glandulae sudoriferae zwar sympathisch innerviert seien, aber nur auf Parasympathomimetica ansprechen. Das Pharmakon wurde durchweg subcutan oder intravenös injiziert. Hier sind vor allen Dingen die Arbeiten von LANGLEY, DIEDEN, SCHILF u. MANDUR zu nennen.

Bei kritischer Betrachtung wird es einsichtig, warum diese Forscher zu einem dem unsrigen entgegenlautenden Ergebnis kommen mußten. Meistens wurden die Experimente an Tieren (Katzen, Meerschweinchen und andere) ausgeführt. Hierbei ist zu bedenken, daß die Ergebnisse von Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Bei der intravenösen Injektion am Menschen wird wohl die schnelle Verteilung und dadurch starke Verdünnung der Grund gewesen sein, warum die Applikation keinen positiven Erfolg zeitigte. Wird Adrenalin subcutan injiziert, so können wir nach eigenen Experimenten nur den von LANGLEY geäußerten Zweifeln zustimmen, weil schon die Reizung der Haut durch den Einstich eine Sekretion hervorruft. So ist es verständlich, wenn FELDBERG (1948) und GROSSE-BROCKHOFF (1950) noch äußerten, auf die Applikation von Adrenalin beim Menschen erfolge keine Schweißsekretion.

Nur vereinzelt fanden wir in der Literatur Hinweise, daß Adrenalin auch hier sekretionsfördernd wirkt, so bei L. R. MÜLLER. Er stellt einem zähen, kalten Angstschweiß einen dünnflüssigen Temperaturschweiß gegenüber, wobei der erstere durch Adrenalin, der letztere durch Pilocarpin hervorgerufen werde. BILLIGHEIMER u. KNAUER kamen bei neurologischen Untersuchungen zu demselben Ergebnis. In der wissenschaftlichen Literatur der letzten sechzig Jahre ist FREUND der einzige Autor, der in einem wenig beachteten, kurzen Bericht auf Adrenalin als Diaphoreticum hinweist; allerdings gibt auch er als Applikationsmethode die Iontophorese an.

So haben wir Experimente über die Wirksamkeit des Adrenalins auf die menschliche Schweißsekretion bei Einführung auf elektrophoretischem Wege angestellt. Weiterhin wurde die Wirkung von Adrenalin mit der von anderen Pharmaka verglichen und die Abhängigkeit der Sekretion von der Blutzirkulation und der Temperatur untersucht; außerdem wurde die p_H -Reaktion des Schweißes festgestellt.

Methodik.

LEDUC u. GONZALES QUIJANO SANCHEZ gaben zum ersten Male 1902 die Möglichkeit des Adrenalintransportes in die Haut mit Hilfe des elektrischen Stromes an. EBBECKE beschrieb 1922 ein kataphoretisches Verfahren, das in seinem Institut zu vielfachen Versuchen Anwendung fand, und nach dem auch wir arbeiteten.

Als Anode verwandten wir eine Flüssigkeits Elektrode. Sie bestand aus einem kurzen, beiderseits offenen Glasrohr von 1,6 cm Durchmesser mit glatt abgeschliffenen Rändern, welches in ein nach allen drei Dimensionen bewegliches Stativ eingespannt und so auf die Haut gesetzt wurde, daß die ins Röhrchen eingefüllte Flüssigkeit nicht abfließen konnte. Als Elektrode diente eine unpolarisierbare Zink-Zinksulfat-Tonelektrode. Die Kathode war eine Handgriffelektrode. Als Gleich-

stromquelle diente eine Anodenbatterie; in den Stromkreis waren außer einem Schlüssel noch ein Amperemeter eingeschaltet. Wir arbeiteten in allen Versuchen mit einer Stromstärke von einem Milliampere und einer Durchströmungszeit von einer Minute. Dabei war es je nach Körperteil und Konzentration erforderlich, Spannungen von 30 V bis 75 V zu verwenden, wie auch durch das festere bzw. losere Anfassen der Kathode die festgesetzte Stromstärke konstant gehalten wurde, die während der Durchströmung wegen des abnehmenden Hautwiderstandes steigt. So konnten wir die Verwendung eines Potentiometers vermeiden. Wir arbeiteten also stets mit 0,5 mA/cm², wobei wir eine Schädigung der Haut nicht

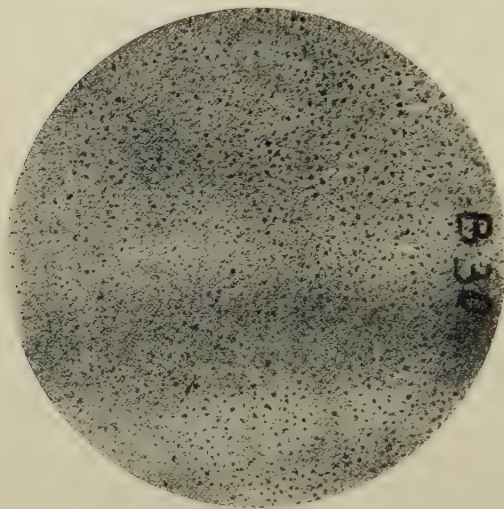


Abb. 1. Bild der normalen Schweißsekretion; aufgenommen an der regio abdominis media nach 15 min Papierauflage.

beobachten konnten. Jedesmal wurde auf guten Kontakt der elektrischen Verbindungen, auf Sauberkeit der Geräte und der Haut geachtet.

Verwendet wurden stets frisch hergestellte Lösungen von Suprareninum basicum crystallisatum purissimum Bayer in Aqua destillata mit einem Zusatz einer isomolekularen Menge 1% iger Salzsäure. Im Normalfalle verwendeten wir Lösungen von 1 : 1000.

Zur Fixierung der auftretenden Schweißsekretion wandten wir ein von KADATZ angegebenes Verfahren von AUBERT an. Hierbei wurde ein glattes, dünnes Filtrierpapier, meist kreisförmige Scheiben von 4,5 cm Durchmesser (Schleicher & Schüll Nr. 597), auf die Haut gelegt und durch ein darauf gesetztes Gewicht (z. B. gut gesäubertes Becherglas) angedrückt. Das Zeitintervall zwischen Ende der Elektrophorese und Auflage des Papierscheibchens betrug stets 30 sec. Nach einiger Zeit, die je nach Versuchsanordnung verschieden war, wurde das Papier mit einer sauberen Hornpinzette entfernt und 30 sec lang in eine Schale gebracht, die 0,5% iges Argentum nitricum solum enthielt. Danach wurde es dem Sonnenlicht bzw. der Bestrahlung einer Bogenlampe ausgesetzt. Nach einigen Minuten traten dann dunkelbraune Pünktchen auf, die die Schweißtropfen vor den Drüsenmündungen mar-

kierten. Die Filtrierpapiere dürfen vorher nicht mit den Fingern berührt worden sein. Im Unterschied zu LOEWY u. WECHSELMANN fanden wir keine Versager. Wenn eine Schweißsekretion in Gang ist, genügt eine Filtrierpapierauflage von 1 sec, um sie Sekretion zu fixieren.

Zum Vergleich wurde an den Fingerbeeren gelegentlich auch die JÜRGENSENsche Methode angewendet.

Bei der angewendeten Stromstärke kam es nicht zu Schmerzen, Rötungen oder gar blasigen Hautdefekten (EBBECKE); nur an der regio frontalis waren den Vpn. die selbst durch Einschleichen nicht zu vermeidenden Lichterscheinungen so störend, daß hier von der Kataphorese abgesehen wurde.

Die Zimmertemperatur betrug bei den Versuchen durchschnittlich 18—20° C, die relative Luftfeuchtigkeit schwankte um 50% und als Körperoberflächentemperatur wurden 29—31° C gemessen.

Um eine sichere Beurteilung der durch die eingebrachten Pharmaka verursachten Schweißsekretion zu ermöglichen, wurden störende Einflüsse infolge von physischen oder psychischen Leistungen strengstens vermieden.

Versuche.

Als Kontrolle wurde zunächst mit dem photochemischen Verfahren die normale Schweißsekretion an den verschiedenen Körperregionen untersucht, d. h. die Zeit festgestellt, die erforderlich ist, bis bei völliger Ruhe und Vermeidung jeglicher psychischer Alterationen die Sekretion auftritt. Außerdem teilten wir die punktförmigen Verfärbungen der Filtrierpapiere in 4 Stärkegrade ein, die wenigstens eine relative Beurteilung erlauben.

1. *Die Beeinflussung der Schweißsekretion durch Applikation von Adrenalin am Unterarm.* An der regio antibrachii volaris ist nach durchschnittlich 30 mP (gleich 30 min kontinuierlicher Papierauflage) eine Sekretion nachweisbar, allerdings mit stärkeren individuellen Schwankungen. Die Applikation von Adrenalin zeigte entgegengesetzte Wirkungen der stärkeren (bis zu $1:10^5$) und der schwächeren Konzentrationen ($1:10^6$ bis $1:10^8$). Jene ergaben eine Sekretionssteigerung, diese eine Hemmung. Brachten wir Adrenalin $1:1000$ ein, so erhielten wir nach 10, 15 und 20 min Papierauflage Bilder ersten, zweiten und dritten Stärkegrades. Die Sekretion setzt nach der fünften Minute bereits ein und hält dann über 25 min an. Bei Konzentrationen von $1:10^6$ bis $1:10^8$ dagegen blieb die Hautfläche, die als Elektrodenfläche gedient hatte, in ihrer Sekretion deutlich zurück und hob sich blasser von der gebräunten Umgebung ab, was allerdings nur dann deutlich wird, wenn die normale Umgebung ohnehin, z. B. durch körperliche Arbeit, zu einer stärkeren

Tabelle 1. *Stärkegrade der Schweißsekretion und die Durchmesser der Schweißpunkte in mm. (Vergleiche hierzu die Abb. 2, 3, 4 und 6.)*

Stärkegrad	Punktdurchmesser in mm
1	—0,1
2	0,1—0,5
3	0,5—1,0
4	größer als 1,0

grades. Die Sekretion setzt nach der fünften Minute bereits ein und hält dann über 25 min an. Bei Konzentrationen von $1:10^6$ bis $1:10^8$ dagegen blieb die Hautfläche, die als Elektrodenfläche gedient hatte, in ihrer Sekretion deutlich zurück und hob sich blasser von der gebräunten Umgebung ab, was allerdings nur dann deutlich wird, wenn die normale Umgebung ohnehin, z. B. durch körperliche Arbeit, zu einer stärkeren

Transpiration gebracht worden war (vgl. Abb. 5). Bei Konzentrationen unter $1:10^8$ war keine Wirkung mehr festzustellen.

In Vergleichsversuchen, bei denen nebeneinander gleichzeitig Adrenalin, physiologische Kochsalzlösung und eine Lösung von 5 Tropfen

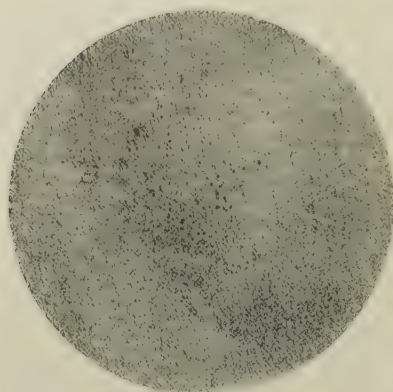


Abb. 2. Vereinzelte Schweißpunkte des Stärkegrades 1 nach Einwirkung von Adrenalin $1:10^3$ und 5 min Papierauflage. Es ist der Elektroden-druckring, der frei von Drüsenpunkten bleibt, zu sehen.

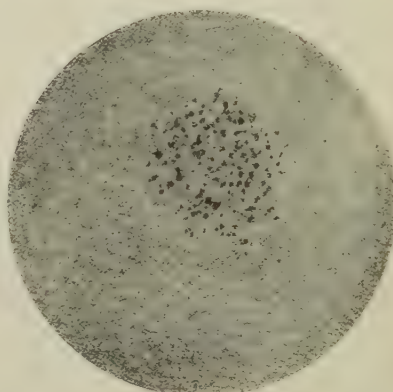


Abb. 3. Schweißpunkte des Stärkegrades 2 nach Adrenalin $1:10^3$ und 15 min Papierauflage.

Die Abb. 2—4 wurden an der regio antebrachii volaris aufgenommen.

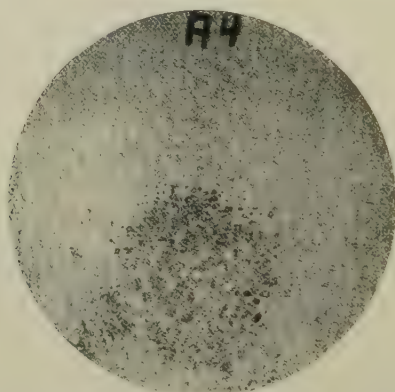


Abb. 4. Schweißpunkte des Stärkegrades 3 nach Adrenalin $1:10^3$ und 20 min Papierauflage.

1%iger Salzsäure auf 10 cm^3 Aqua destillata appliziert wurden, zeigte es sich, daß allein die Adrenalineinführung die Sekretion beschleunigen konnte. Die Säurelösung verursachte Schmerzen und lebhafte Rötung als Zeichen der Hautreizung, aber keine deutliche Sekretionssteigerung. Durch diese Versuche widerlegten wir die Ansicht von LANGLEY, der behauptete, daß durch die Applikation von Adrenalin keine Schweiß-

sekretion erfolgte, sondern daß diese ausschließlich durch das Lösungsmittel hervorgerufen werde.

Alkohol wurde als Lösungsmittel nicht verwendet, da er bereits ohne Adrenalinzusatz eine starke Sekretion hervorruft. — Wenn die Adrenalinlösung, statt durch Elektrophorese durch intra-sive subcutane Injektion appliziert wird, so bewirkt allein schon die Injektion und der Quaddeldruck eine Sekretion, so daß die Adrenalinwirkung nicht mehr deutlich festzustellen ist.

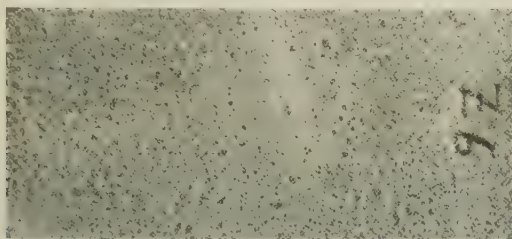


Abb. 5. Hemmung der Schweißsekretion nach Einwirkung von Adrenalin 1:10⁶ und 5 min Papierauflage. (An der regio antebrachii volaris während gleichzeitiger Kniebeugen aufgenommen.)

2. *Die Wirkung von Adrenalin auf andere Hautregionen.* Zu der Wirkung des Adrenalins am Unterarm steht seine Wirkung an Handinnenfläche und Fußsohle in auffallendem Gegensatz. Hier fehlt sowohl eine Förderung als auch eine Hemmung der Schweißsekretion. Auch Azetylcholin und Pilocarpin haben bei elektrophoretischer Applikation keinen Einfluß auf die palmare und plantare Sekretion. Atropin ruft dagegen eine deutliche Lähmung hervor, die 2—3 Std anhält und eine merkwürdig lange Latenzzeit von 15 min hat (wie auch an anderen Hautregionen).

Die Wirksamkeit des Atropins auch durch die Dicke der Epidermis hindurch, die Hautblässe an der Applikationsstelle des Adrenalins beweisen, daß die Mittel mindestens in die oberflächliche Hautschicht bzw. ihre Gefäße gelangen.

Tabelle 2. *Die Regionen des Körpers, ihre normale Schweißsekretion und ihre Reaktion auf Adrenalin.*

Regionen des Körpers	Normalbild*	Nach Adrenalin-Applikation*
Vola manus	5	5
Planta pedis	5	5
Dorsum manus	15	10
Regio frontalis	15	—
Regio antebrachii volaris	30	10
Regio abdominis media	15	—
Regio femoris ventralis	10	8
Regio lumbalis	20	Mehr als 20

* gleich erforderliche Zeit der Papierauflage in Minuten.

So kommen wir zu der Auffassung, daß Adrenalin an den Stellen des Körpers nicht wirkt, an denen auch eine Temperaturerhöhung keine vermehrte Schweißsekretion hervorruft; letzteres beobachtete auch REIN.

Einen Unterschied im Stärkegrad der Schweißsekretion von rechter und linker Hand konnten wir nicht feststellen.

Nach der Einteilung, die LEVA gegeben hat, wurden nun auch an Handrücken, Abdominalregion, Oberschenkel und Hüftregion Versuche angestellt, die bei Anwendung einer Adrenalin-Lösung von $1:10^3$ folgende Befunde hatten:

Am Handrücken bewirkt Adrenalin nach 10 mP eine Sekretion des Stärkegrades 2; an der Abdominalregion konnten Befunde nicht erhoben werden, da die Versuche durch den Bauchdeckenreflex gestört wurden. An der Vorderseite des Oberschenkels fand sich eine mäßige Steigerung, es genügten 8 mP zu einer Sekretion des Stärkegrades 1. In der Hüftregion wirkte Adrenalin hemmend.

3. *Ein Vergleich der sudomotorischen mit der vaso- und pilomotorischen Wirkung.* Ähnlich wie JACOBS sahen wir eine lokale Blässe und das Vorwölben der Haarbälge als Adrenalinwirkung, die ungefähr 15 min in voller Stärke anhielt und in etwa 25 min langsam verschwand. Die Vasoconstriction kann jedoch entgegen der MOOGSchen Auffassung die schweißfördernde Wirkung des Adrenalins nicht verhindern.

4. *Der p_H -Wert des Schweißes.* Mehrere Vpn. wurden unter Beachtung der dazu erforderlichen Umstände (wie Zimmertemperatur, Kleidung, Verabreichung von Diaphoretica usw.) zu einer verstärkten Schweißsekretion angeregt. Hierbei wurden die Stärkegrade und der p_H -Wert des ausgeschiedenen Schweißes an Unterarm und Handinnenfläche beobachtet.

Dabei kamen wir zu dem Ergebnis, daß die Unterarme zwar eine stärkere Reaktion zeigen als die Hände (was mit den bereits bekannten Ergebnissen übereinstimmt), sich jedoch in bezug auf den p_H -Wert des ausgeschiedenen Sudors keine Unterschiede der Reaktion finden lassen. Der ausgeschiedene Schweiß hat unmittelbar nach der Sekretion einen p_H -Wert von ungefähr 6,7, d. h. er ist leicht sauer.

Tabelle 3. *Stärkevergleich von Adrenalin ($1:10^3$) und Pilocarpin ($1:10^3$) an der Innenseite des Unterarms.*

Adrenalin		Pilocarpin	
Zeit*	Stärkegrad**	Zeit*	Stärkegrad**
10	1—2	3	1—2
15	2	5	2—3
20	2—3	10	4

* gleich erforderliche Zeit der Papierauflage in Minuten.

** siehe S. 357.

5. Ein Vergleich der Wirkung von Adrenalin, Pilocarpin und Atropin.

Die Adrenalinwirkung unterscheidet sich von der des Pilocarpins dadurch, daß die Pilocarpinwirkung drei- bis viermal so stark ist als die des Adrenalins, aber entgegen BILLIGHEIMER dem Adrenalin nicht antagonistisch ist. Eine Irradiation (LANGLEY) des lokal applizierten Pilocarpins sahen wir nicht.

Atropin hingegen beseitigt sowohl die Adrenalin- wie die Pilocarpinwirkung.

Eine Depotwirkung des Adrenalins, wie sie sich für die Vasoconstriction und die Pilomotorik findet (JACOBS), konnten wir für die Sudomotorik nicht beobachten.

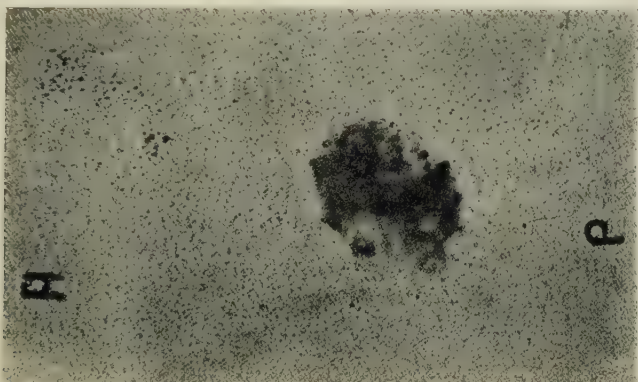


Abb. 6. Vergleichsbild von $1:10^3$ Adrenalin (A) und Pilocarpin (P) nach 10 min Papieraufgabe. Die Schweißsekretion nach der Applikation von Pilocarpin zeigt ein Bild des Stärkegrades 4. Außerhalb der Applikationsflächen ist eine Sekretion infolge psychischer Alteration sichtbar.

6. *Die Wirkung von Adrenalin am anaemischen Unterarm.* Die Transpiration ist nicht von der Blutzirkulation abhängig; diese Tatsache ist schon von DIEDEN, FREUND und SCHWENKENBECHER bestätigt worden. Eine Abhängigkeit der adrenalinbedingten Schweißsekretion fand sich nur insofern, als an einem in ESMARCSche Blutleere versetzten Arm, bei dem allerdings gleichzeitig die Hauttemperatur auf 28°C zurückging, die sekretionsfördernde Wirkung des Adrenalins deutlich schwächer ausfiel.

Daraus geht hervor, daß die Schweißsekretion zwar unabhängig von der Blutzirkulation ist, jedoch dürfte ihr durch den fehlenden Nachschub von Stoffwechselprodukten und die sinkende Hauttemperatur eine Grenze gesetzt sein.

7. *Die Abhängigkeit der adrenalinbedingten Schweißsekretion von der Hauttemperatur.* Hier bestehen Untersuchungen von WILLEBRAND, der schon 1902 für die normale Transpiration eine kritische Hauttemperatur von $30\text{--}33^{\circ}\text{C}$ angab. LOEWY u. WECHSELMANN behaupteten dagegen, an drüsenreichen Körperstellen träten schon bei 24°C Hauttemperatur die ersten Schweißpunkte auf und bei $26,6^{\circ}\text{C}$ sei an

allen Körperregionen eine Sekretion nachweisbar. KURÉ, OKINAKA, MAÉDA u. KATO stellten bei Versuchen an Katzen ein Parallelgehen zwischen sympathischer Innervation und Wärmewirkung fest.

Wärme wurde durch Bestrahlungen mit einem elektrischen Heizofen, mit einer Infrarotlampe und durch das Bestören mit der angewärmten Luft eines Föns appliziert. Hierbei stellten wir fest, daß Infrarotstrahlen die Wirkung von Adrenalin verdoppelten, ohne die Umgebung zu einer verstärkten Sekretion zu veranlassen; weiter, daß bei gleichzeitiger Applikation von Adrenalin und Wärme die Drüsen in der Umgebung des Elektrophoresefeldes eher sezernieren als die mit Adrenalin versehenen, die erst nach einer Latenzzeit von 2 min reagieren, dann allerdings nach weiteren 8 min die wärmebedingte Sekretion übertreffen. Die Hauttemperatur betrug bei diesen Versuchen 31—33° C.

Die Adrenalinwirkung wurde deutlich schwächer, nachdem durch die Kaltluft eines Föns oder durch Aussetzen einer niedrigen Zimmertemperatur von 8° C die Hauttemperatur auf 21—23° C gebracht worden war.

Die Experimente erweisen, daß die Schweißsekretion auch bei Adrenalin-Applikation von der Temperatur abhängig ist. Hauttemperaturen unter 30° C behindern, höhere fördern die Sekretion.

Maßgebend für die Reaktion des Körpers ist nicht nur die Außentemperatur, sondern auch der allgemeine Tonus der glatten Muskulatur bzw. des Myoepithels (SCHAFFER).

Deutung der Ergebnisse.

Wir erhielten bei unseren Experimenten von der bisherigen Forschung abweichende Ergebnisse. Wir konnten einwandfrei feststellen, daß auf die Einbringung von Adrenalin hin eine Schweißsekretion erfolgt. Eine Tatsache, die wir vor allen Dingen auf die elektrophoretische Applikation und auf die angewendeten Beobachtungsmethoden zurückführen. Dabei wirkte Adrenalin peripher und nicht zentral, weil, wie DIEDEN bereits publizierte, eine Sekretion auch nach Nervendurchtrennung noch stattfindet. Auch Axonreflexe dürften für die Adrenalinwirkung bei unseren Versuchen nicht in Tätigkeit treten, da sonst ein größeres Hautgebiet als nur das Elektrophoresefeld Sekretionserscheinungen zeigen müßte.

Wie bereits oben angeführt rufen sowohl Parasympatho- wie Sympathomimetica eine Schweißsekretion hervor. Für die Erklärung dieses Befundes lassen sich drei Theorien anführen. HOLMGREEN beobachtete in den sekretorischen Endstücken der glandulae sudoriferae zwei verschiedene Arten von Zellen (filtratorische und spezifische); KÖLLICKER nimmt zwei Gruppen von Schweißdrüsen an und BIEDL spricht von einer doppelten Innervation. Letzterer Hypothese neigen auch wir zu, da beide Gruppen von Substanzen sowohl eine Förderung als auch eine Hemmung hervorrufen können.

Adrenalin fördert die Schweißsekretion in Konzentrationen von $1 : 10^3$ bis $1 : 10^5$, es hemmt in Konzentrationen von $1 : 10^6$ bis $1 : 10^8$. Um diese verschiedenartige Wirkung zu verstehen, muß der Vorgang der Schweißsekretion in seinen einzelnen Phasen betrachtet werden.

So ist eine Herstellung des Schweißes (Sekretion in sensu strictiori) von seiner Ausstoßung (Expulsion) zu unterscheiden, wie EBBECKE in seiner neusten Veröffentlichung hervorhob. Wir würden annehmen, daß das Adrenalin spezifisch auf die Expulsion einwirkt. Nun konnte aber JACOBS nachweisen, daß elektrophoretisch eingebrachtes Adrenalin auf die glatte Muskulatur der Haut bzw. der Hautanhangsgebilde ebenfalls einwirkt, so z. B. die Haare aufrichtet, die Capillaren enger stellt. Dabei findet eine allgemeine Straffung der Haut statt. Diese verschließt die Schweißporen mit solcher Kraft, daß der durch die schwachen Adrenalin-konzentrationen hervorgerufene Expulsionsdruck nicht ausreicht, um die Hautspannung zu überwinden, während bei den höheren Konzentrationen der Expulsionsdruck größer ist als die Verschlößkraft, die auf die Mündungen einwirkt.

Zuletzt sei noch auf die Sonderstellung der Handinnenflächen und der Fußsohlen eingegangen. An beiden rief Adrenalin (der Wirkung von Wärme parallel) weder eine Förderung noch eine Hemmung hervor. Dies mag darin begründet sein, daß diesen Organen nach der Ansicht von EBBECKE phylo- und ontogenetisch als Haft- und Stützflächen ursprünglich eine andere Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung.

Die Wirkung von Adrenalin auf die Tätigkeit der Schweißdrüsen beim Menschen wurde an verschiedenen Körperregionen untersucht. Dabei wirkt es in Konzentrationen von $1 : 1000$ bis $1 : 100000$ fördernd, von $1 : 1$ Million bis $1 : 100$ Millionen hemmend. Die Wirkungsschwelle liegt bei $1 : 1$ Milliarde. Dabei wurde aufgewiesen, daß Adrenalin streng lokal wirkt. Bei der Förderung der Schweißsekretion überwiegt offenbar der Expulsionsdruck über der Hautspannung, bei der Hemmung tritt das umgekehrte Verhältnis ein.

Adrenalin wirkt fördernd oder hemmend an *dorsum manus*, *regio antebrachii volaris* und *regio femoris ventralis*. An *vola manus* und *planta pedis* gelangt Adrenalin wie auch Pilocarpin und Azetylcholin nicht zur Wirkung.

Die vaso-, pilo- und sudomotorischen Reaktionen sind an *dorsum manus*, *regio antebrachii volaris* und *regio femoris ventralis* konform. Sowohl die Unterarme als auch die Hände scheiden sauren Schweiß aus. Pilocarpin wirkt drei- bis vierfach stärker als Adrenalin. Der Antagonist zu beiden Substanzen ist Atropin. Die adrenalinbedingte Schweiß-

sekretion ist unabhängig von der Blutzirkulation, es besteht jedoch eine Abhängigkeit von der Temperatur; das Optimum liegt hier bei 31° C Hauttemperatur.

Literatur.

- AUBERT, P.: Ann. de Dermat. **9** (1877). — BIEDL: Innere Sekretion. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1913. — BILLIGHEIMER u. KNAUER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **88**, 172 (1920). — DIEDEN, H.: Arch. klin. Med. **117**, 180 (1915). — Z. Biol. **66**, 387 (1916). — EBBECKE, U.: Pflügers Arch. **169**, 1 (1917); **190**, 230 (1921); **195**, 300 (1922); **199**, 197 (1923); **253**, 333 (1951). — FELDBERG: Human Physiology by Winton and Bayliss, 1948. — FREUND, E.: Wien. klin. Wschr. **1920**, 1009. — GROSSE-BROCKHOFF, F.: Patholog. Physiologie. Berlin: Springer 1950. — HOLMGREEN, E.: Anat. Anz. **55**, 553 (1922). — JACOBS, D.: Z. exper. Med. **99**, 195. — JÜRGENSEN, E.: Arch. klin. Med. **144**, 193, 248 (1924); **149**, 157 (1925). — KADATZ, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **210**, 159 (1950). — KÖLLICKER: zit. nach SCHWENKENBECHER. — KURÉ, OKINAKA, MAÉDA u. KATO: Pflügers Arch. **237**, 40 (1936). — LANGLEY, J.: J. of Physiol. **27**, 237 (1901); **56**, 110 (1922). — Das autonome Nervensystem. Berlin: Springer 1922. — LEVA, J.: Münch. med. Wschr. **1913**, 2386. — LOEWY u. WECHSELMANN: Virchows Arch. **206**, 79 (1911). — MOOG, O.: Z. exper. Med. **31**, 318 (1923). — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **98**, 75 (1923). — Hautfunktionsprüfungen. Jena: Fischer 1927. — MÜLLER, L. R.: Die Lebensnerven. Berlin: Springer 1924. — REIN, H.: Klin. Wschr. **1925**, 1. — Einf. i. d. Physiol. Berlin: Springer 1948. — SCHAFFER: Lehrb. d. Histol., 3. Aufl. — SCHILF u. MANDUR: Pflügers Arch. **196**, 345 (1922). — Klin. Wschr. **1923**, 506. — SCHWENKENBECHER, A.: Arch. klin. Med. **79**, 32 (1904). — Hdb. d. norm. u. pathol. Physiol. Berlin: Springer 1929. — WILLEBRAND, E. v.: Skand. Arch. **13**, 337 (1902).

Dr. med. et Dr. phil. HANNS JOACHIM ENGELS,
z. Z. Medizinische Klinik Wuppertal-Elberfeld.

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. W. BICKENBACH).

Über den Einfluß von Megaphen auf die Wurzelspitzenzellen von *Vicia faba equina*.

Von

K. PETERS und H. LEHR.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Dezember 1953.)

Die Anwendung von Megaphen N-(3'-Dimethylamino)-propyl-3-chlorphenothiazin auf den lebenden Organismus erfordert neben Untersuchungen über die Wirkung auf die verschiedenen physiologischen Vorgänge im Körper ebenso Kenntnisse über den Einfluß auf die Zelle und die Zellteilung. DRIESSENS (1952) beobachtete an Gewebekulturen durch planimetrische Ausmessung des Wachstumsareals eine völlige Wachstums hemmung bei Verwendung von Phénergan (= Atosil) (N-(2'-Dimethylaminoäthyl)-phenothiazin in einer Konzentration von 0,05 g/100 cm³. Bei einer Konzentration von 0,01 g/100 cm³ Phénergan im Medium war ein Unterschied gegenüber den Kontrollkulturen nicht mehr festzustellen.

Es schien nun wünschenswert festzustellen, wie Megaphen auf die Zelle, die Zellteilung und die Chromosomen wirkt.

Material und Methode.

Als Untersuchungsmaterial wurde genetisch reines Saatgut von *Vicia faba equina* benutzt, da das Wurzelspitzenmeristem von *Vicia* ein besonders günstiges Objekt für die Beobachtung stofflicher Einflüsse ist. In den einzelnen Versuchsserien wurden jeweils 14 Bohnen für jeden Fixierungspunkt in Leitungswasser bei 22° C zur Ankeimung gebracht. Nach 4 Tagen hatten die Keimlinge eine Wurzellänge von etwa 15 mm erreicht. Es wurden jeweils 6 Bohnen entsprechender Wurzellänge ausgesucht, so daß nur physiologisch gleichartig reagierendes Material verwendet wurde. 3 Bohnen wurden in der Weise in Apparaturen gehalten, daß die Wurzeln in einer Länge von 1 cm in die mit Megaphen versetzte Nährlösung tauchten. Die Nährlösung nach von DER CRONE enthält auf 1000 ml aqua dest.: 1 g KNO₃; 0,5 g MgSO₄; 0,5 g CaSO₄; 0,25 g Ca₃(PO₄)₂; 0,25 g Fe₃(PO₄)₂. Die 3 Kontrollen wurden in entsprechenden Vorrichtungen nur der Nährlösung ausgesetzt. In Abständen von 2, 4, 7, 16 und 24 Std wurden die Wurzelspitzen in FLEMMINGScher Lösung fixiert. Für die cytologische Untersuchung wurde die Nuclealquetschmethode nach HEITZ angewandt. Von jeder Wurzelspitze (etwa 4 mm Länge) wurden 4 Quetschpräparate hergestellt. Aus jedem Präparat wurden 20 Gesichtsfelder der meristematischen Zone ausgezählt (Ok. 10mal; Objekt. A = 1,30) und die darin

enthaltenen Mitosen und Interphasezellen ausgewertet. Insgesamt wurden 100000 Zellen und davon 10000 Mitosen ausgewertet. Damit liegen jedem Fixierungspunkt in jeder Versuchsreihe ungefähr 4700 Zellen und davon durchschnittlich 470 Mitosen zugrunde. Die beigelegten Photographien wurden mit der Leica in Verbindung mit dem Ortholux (Leitz) Ok. Periplan 10mal; Objektiv $A = 1,30$) und dem Mikraufsatz „Mikas“ aufgenommen.

Versuchsergebnisse.

Bei den beobachteten Veränderungen unter dem Einfluß von Megaphen handelt es sich um Effekte, die nur auf die Megaphenwirkung zurückzuführen sind. Die Versuche mit dem Lösungsmittel, welches von den Bayer-Werken (Leverkusen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, ergaben bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ keine

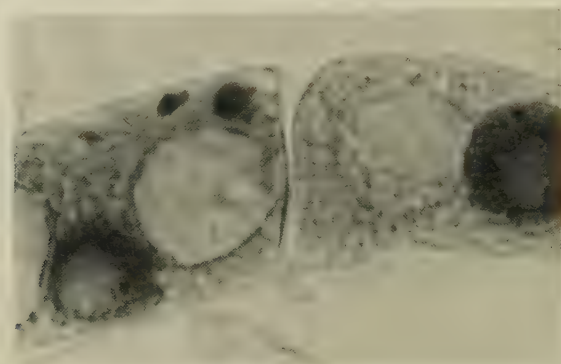


Abb. 1. Interphasezelle. Megaphen $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$, 2 Std. Einwirkungszeit. Vakuolenbildung. Originalaufnahme 600 : 1, vergrößert auf 1200 : 1.

sichtbaren morphologischen Veränderungen. Die Mitosehäufigkeitskurve (Abb. 5), sowie die mittlere Phasenverteilung (Tab. 1) bestätigen ebenfalls, daß das Lösungsmittel ohne Einfluß ist.

Nach 2ständiger Einwirkungszeit von $2 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ Megaphen waren die Zellen bereits irreversibel geschädigt. Aus dem Grunde wurde der Konzentrationsbereich nicht weiter untersucht. Die Verwendung einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ rief ebenfalls irreversible Schäden hervor. Nach 2 Std. wurden im Cytoplasma der meristematischen Zellen große Vakuolen beobachtet (Abb. 1), die auf Veränderungen der Permeabilität des Plasmalemmas oder auf cytoplasmatische Entmischungsvorgänge zurückzuführen sind. Chromosomale Veränderungen wurden nach 4 bzw. 7ständiger Einwirkungszeit von $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ Megaphen beobachtet. Aus der Abb. 2 ist ersichtlich, daß die Chromosomen kontrahiert sind. Daraus ist zu schließen, daß das Megaphen nicht nur im Cytoplasma, sondern auch an den Chromosomen Veränderungen hervorruft. Dieser Effekt wird nach einer Einwirkungszeit von 24 Std.

noch verstärkt und kann zu irreversiblen Schädigungen führen. Es ist von Bedeutung, daß diese Wirkung auch bei Pro- und Anaphasen zu beobachten ist. Gegenüber den Kontrollen sind z. B. die Prophasekerne

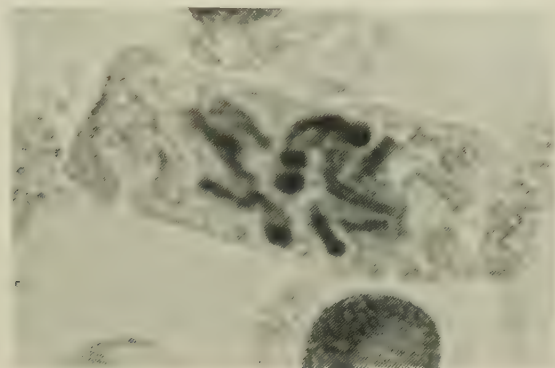


Abb. 2. Metaphase mit kontrahierten Chromosomen. Megaphen $2 \cdot 10^{-4}$ g/cm³, 7 Std Einwirkungszeit. Originalaufnahme 630 : 1, vergrößert auf 1200 : 1.

unter Megaphen geschrumpft und die Chromosomen kontrahiert (Abb. 3). Nicht nur die in Teilung befindlichen Zellen werden durch Megaphen beeinflusst, sondern auch Interphasezellkerne. In der Abb. 4 sind 2 Kerne

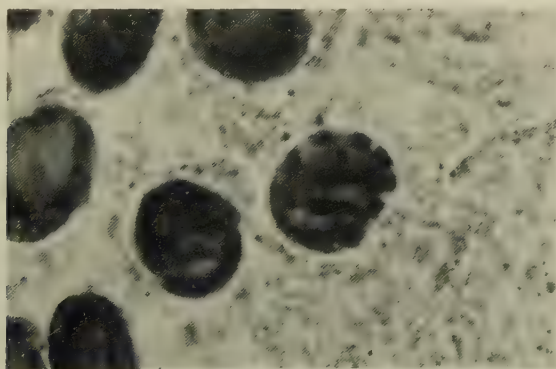


Abb. 3. Überalterte Prophase. Megaphen $2 \cdot 10^{-5}$ g/cm³, 4 Std Einwirkungszeit. Originalaufnahme 630 : 1, vergrößert auf 1200 : 1.

abgebildet, deren Nucleolen stark aufgetrieben sind. Ein Effekt, der für eine Beeinflussung des Nucleolusapparates charakteristisch ist.

Die mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Megaphen behandelten Wurzeln zeigten noch zum Teil die oben beschriebenen Veränderungen, jedoch zu einem geringeren Grad. Auf Grund der Beobachtungen können diese Wirkungen als reversibel betrachtet werden.

Zur weiteren Analyse wurde das Teilungsgeschehen der Zellen unter Megaphen statistisch erfaßt. Die Mitosehäufigkeitskurven (Abb. 5) lassen erkennen, daß bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ Megaphen

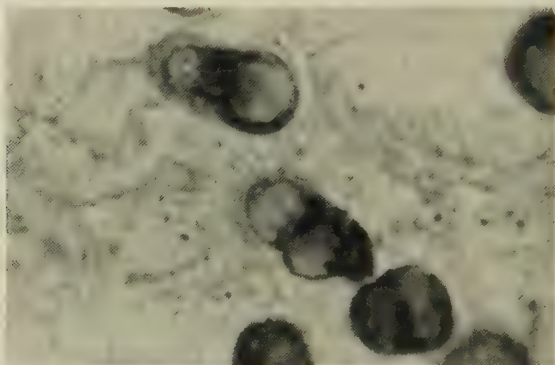


Abb. 4. Interphasekerne mit aufgetriebenen Nucleoli. Megaphen $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$, 24 Std Einwirkungszeit. Originalaufnahme 630 : 1, vergrößert auf 1200 : 1.

das Wachstum praktisch eingestellt ist. Die mittlere Mitosehäufigkeit beträgt 1,7%. Die cytologische Analyse ergab zudem eine Unterbrechung des Mitosevorganges, da die Zellen bereits während der Teilung irrever-

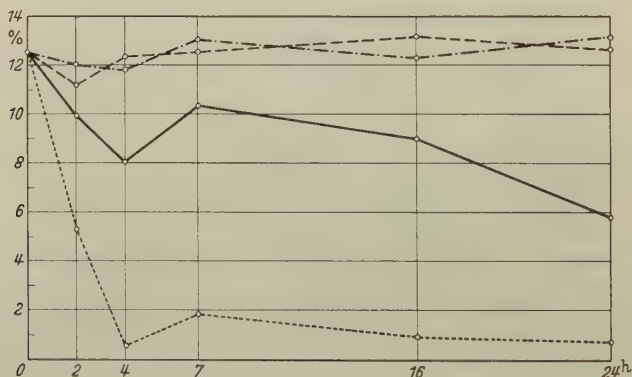


Abb. 5. Mitosehäufigkeitskurven im Wurzelspitzenmeristem von *Vicia faba equina* nach Einwirkung von Megaphen. — Kontrollen (---); Lösungsmittel ohne Megaphen $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ (— · — · —); Megaphen $2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ (—); Megaphen $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ (·····). Ordinate: Zahl der Mitosen in % der Zellen. Abszisse: Einwirkungszeit in Stunden.

sibel geschädigt werden. Demgegenüber ist bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ die mittlere Mitosehäufigkeit nur vermindert, und zwar von 12,5% bei den Kontrollen auf 8,7%. Der Abfall der Mitosehäufigkeitskurve bei 24 Std deutet darauf hin, daß hier bereits stärkere

Schäden eintreten. Neben reversiblen wurden auch irreversible Veränderungen beobachtet.

Die prozentuale Verteilung der Mitosephasen ergab weitere Ergebnisse. Die Phasenverteilung der Versuchsreihe ($2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$) in der

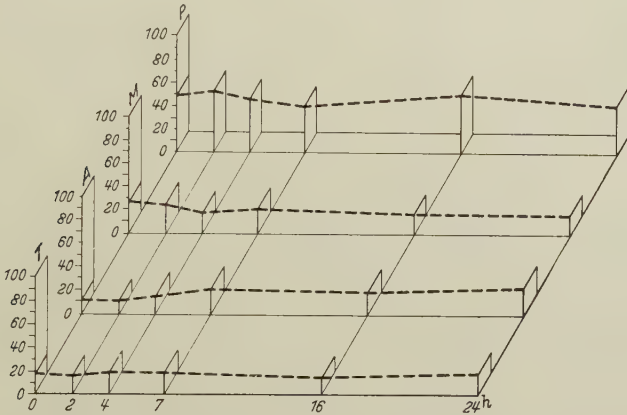


Abb. 6. Verteilung der Mitosephasen in den mit $2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ Megaphen behandelten Wurzelspitzenzellen von *Vicia faba equina*. Ordinaten: Zahl der Mitosephasen in % der Gesamtmitosen. Abszissen: Einwirkungszeiten in Stunden. P Prophasen, M Metaphasen, A Anaphasen, T Telophasen.

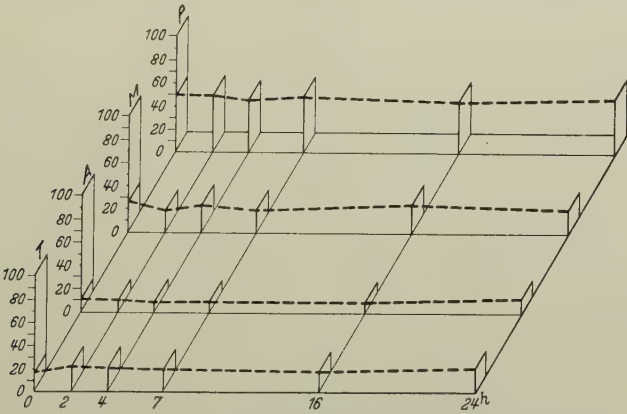


Abb. 7. Verteilung der Mitosephasen in den Wurzelspitzenzellen von *Vicia faba equina*. Ordinaten: Zahl der Mitosephasen in % der Gesamtmitosen. Abszissen: Fixierungszeiten in Stunden. P Prophasen, M Metaphasen, A Anaphasen, T Telophasen.

Abb. 6 zeigt gegenüber den Kontrollen in der Abb. 7 eine Zunahme der Anaphasen. Diese Zunahme tritt nach 2 Std ein und bleibt über die ganze Versuchszeit erhalten. Daraus läßt sich schließen, daß die Zellteilungsdauer verlängert ist. Der Vergleich der mittleren Phasenverteilungen läßt diese Erscheinung noch besser erkennen (Tab. 1).

Tabelle 1. *Mittlere Mitosephasenverteilung im Zeitraum von 2—24 Std.*

Phasen in %	Pro-	Meta-	Ana-	Telo-
Kontrollen	46,8	21,6	11,1	20,5
Lösungsmittel	46,2	20,4	12,8	20,6
Megaphen 2 · 10 ⁻⁵ g/cm ³ . . .	45,5	19,2	17,7	17,5
Megaphen 2 · 10 ⁻⁴ g/cm ³ . . .	71	13	5,1	10,9

Die mittlere Mitosephasenverteilung bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ g/cm³ wurde der Vollständigkeit halber mit aufgeführt. Ein Bild der Phasenverteilung wurde jedoch nicht gezeichnet, da in dem untersuchten Bereich von 17000 Zellen nur 300 Mitosen registriert wurden. Diese Zahl ist zu gering, um daraus nähere Schlüsse ziehen zu können. Die erhöhte Zahl der Prophasen könnte gegebenenfalls auf eine Blockierung des Übergangs von der Prophase in die Metaphase hinweisen.

Die Beobachtung, daß pathologische Mitosen wie Chromosomenverklebungen oder Fragmentationen eher in geringerer Häufigkeit als in den Kontrollen beobachtet wurden, sei besonders erwähnt.

Diskussion der Befunde.

COURVOISIER u. Mitarb. (1953) untersuchten die durch Megaphen verursachte Atmungshemmung an Gehirngewebeschnitten von Meerschweinchen. Im Bereich physiologischer Konzentrationen, wie sie im Tierversuch verwendet wurden, ermittelten sie eine Atmungshemmung zwischen 21 und 62%. Möglicherweise sind die erhaltenen Befunde auf eine Hemmung des Atmungsstoffwechsels der Zelle zurückzuführen. Die unter einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ Megaphen auftretenden Störungen des Zellkernes ergaben folgendes Bild: Durch die Blockierung des Überganges vom Ruhekern zum Prophasekern wird die Mitosehäufigkeit vermindert. Durch Verschiebung des prozentualen Anteiles der Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen an der Gesamtmitosehäufigkeit ist auf die Verlangsamung des Ablaufes der Mitose zu schließen. Auffallenderweise ist unter Megaphen der Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ g/cm³ die Anaphase besonders verlängert. Die Frage, ob der verlangsamte oder pathologische Zellstoffwechsel diesen Vorgang hervorruft oder ob der Mechanismus Adenosintriphosphorsäure — Spindelfaser direkt beeinflußt wird, muß unbeantwortet bleiben. Es sei jedoch hervorgehoben, daß es sich bei der Bewegungsstörung nur um eine zeitliche Differenz in der Anaphasenbewegung handelt.

Von Interesse ist, daß wir den Befund von DECOURT (1953) bestätigen konnten, der ebenfalls im Konzentrationsbereich von 2 bis $3 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ Megaphen irreversible Schädigungen bei Pflanzen (*Lepidium sativum*) wie auch bei Infusorien, Pilzen und Bakterien feststellte. Unser Befund, daß bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ Megaphen nach 24stündiger Einwirkungszeit in bestimmten Grenzen irreversible Schädigungen auftraten, weist auf die Bedeutung der Einwirkungszeit hin. Eine Verstärkung der unter $2 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$ Megaphen beobachteten Schäden an den Chromosomen wurde nach Einwirkung von $2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$ festgestellt. Die Dimensionsänderungen der Chromosomen, die nicht nur die Länge, sondern auch die Dicke betreffen, können gegebenenfalls auf indirekte oder direkte Einflüsse zurückzuführen sein. Wie es den Anschein hat, handelt es sich bei der Chromosomenkonzentration um einen unspezifischen Effekt, der durch die verschiedensten Stoffe ausgelöst werden kann.

Colchicin (LEVAN, 1938) verursacht neben seiner spezifischen Wirkung auf die Teilungsspindel auch eine Kontraktion der Chromosomen. Narkotica wie Chloroform, Trichloräthylen oder Methylurethan wirken ebenfalls c-mitotisch und chromosomenverkürzend (ÖSTERGREN, 1944). Eine Chromosomenkontraktion wurde auch bei Stoffen beobachtet, die c-mitotisch unwirksam sind, wie Harnstoff oder Anthracen (ÖSTERGREN, 1944). ÖSTERGREN führte die Wirkung von Colchicin und die der Narkotica auf eine Beeinflussung der lipoiden Radikale der Polypeptidketten zurück, was zu einer engeren Faltung der Polypeptidketten führen soll. Die Aufhebung der Narkosewirkung auf Bakterien durch die Einwirkung hoher Drucke (JOHNSON, 1942) führte zu der Annahme, daß die Narkotica nicht an spezifisch wirkenden Zentren der Enzyme angreifen, sondern eine Denaturierung der Proteine bewirken. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Untersuchungen von QUASTEL (1943) hingewiesen, der eine Beeinflussung der Atmung von Gehirngewebsschnitten bei niedriger Konzentration der Narkotica im Bereich der Cytochrome, Flavoproteine und Coenzyme fand, während bei hohen Konzentrationen die Dehydrogenase gehemmt wurde. Während im vorliegenden Beispiel die Konzentration eines Narkoticums den Wirkungsmechanismus beeinflusst, ist in dem folgenden Beispiel der gleiche morphologische Effekt zweier verschiedener Narkotica von entgegengesetzten physiologisch-chemischen Reaktionen begleitet. DANIELLI (1950) beschreibt Dichlorphenol und Urethan als zellteilungshemmend bei Seeigeleiern. Während bei Urethan die Atmung dabei um 75% vermindert wird, steigert Dichlorphenol den Atmungsstoffwechsel um mehr als 100%. Dieses Beispiel wurde erwähnt, um zu zeigen, daß eine Spindelhemmung bzw. eine Chromosomenkontraktion nicht unbedingt mit einer Atmungsstoffwechselhemmung gekoppelt sein muß. In Ermangelung anderer physiologisch-chemischer Anhaltspunkte ist es jedoch nahelegend, von der Atmungshemmung an Gewebeschnitten unter Megaphen auf eine Zellstoffwechselhemmung zu schließen, welche sich morphologisch u. a. in einer Chromosomenkontraktion manifestiert. Die Untersuchungen von I. BRAUER (1949, 1950) und FINK (1949) deuten darauf hin, daß es sich bei der Chromosomenkontraktion bzw. der Spiralisierung der Chromosomen nach Temperatur- oder Chemikalienwirkung um recht komplizierte Vorgänge handelt. Die Beobachtung von WOLL (1953), daß Nucleinsäuren in der Nährlösung von *Vicia faba* eine spezifische Wirkung auf den Nucleolus haben, kann möglicherweise zur Erklärung herangezogen werden. Es wäre denkbar, daß durch die Einwirkung von Megaphen u. a. der

Nucleinsäurestoffwechsel gestört ist und es somit zu der starken Ausbildung der Nucleolen in den Interphasekernen kommt. Die morphologischen Erscheinungsbilder der Kernschäden, die MARQUARDT (1950) in ihrer Summe als unspezifische, physiologische Störungen des Zellkernes bezeichnet, können im vorliegenden Falle möglicherweise auf Veränderungen des Zellstoffwechsels bzw. auf Zwischenprodukte des Zellstoffwechsels zurückgeführt werden, die bei der Unterbrechung von Reaktionsketten entstehen.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen kann gesagt werden, daß die Einwirkung von Megaphen auf die Zelle keine tiefgreifenden folgeschweren Veränderungen hervorruft, wenn es nicht zur Anwendung von Konzentrationen kommt, die irreversible Schäden verursachen.

Zusammenfassung.

Aus den morphologischen Bildern und den statistischen Befunden wird geschlossen, daß Megaphen bei *Vicia faba* den Zellstoffwechsel beeinflusst. Als Folge davon ist die Mitosehäufigkeit vermindert. Die Steigerung der Häufigkeit der Anaphasen deutet auf eine Verlangsamung des Mitoseablaufes. Als weitere Reaktion wird die Chromosomenkontraktion beschrieben. Auf morphologische Veränderungen im Cyto- und Caryoplasma sowie am Nucleolus wird hingewiesen.

Literatur.

BRAUER, I.: *Planta* **36**, 411 (1949); **38**, 91 (1950). — COURVOISIER, S., J. FOURNEL, R. DUCROT, M. KOLSKY et P. KOETSCHET: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **92**, 305 (1953). — DANIELLI, J. F.: *Cell physiology and pharmacology*, London 1950. — DECOURT, Ph.: *C. r. Acad. Sci.* **236**, 1195 (1953). — DRIESSENS, J.: *C. r. Soc. Biol.* **146**, 1186 (1952). — FINK, H.: *Chromosoma* **5**, 510 (1949). — JOHNSON, F. H., D. E. BROWN and D. MARSLAND: *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **20**, 269 (1942). — LEVAN, A.: *Hereditas* **24**, 471 (1938). — MARQUARDT, H.: *Naturwissenschaften* **37**, 416, 433 (1950). — ÖSTERGREN, G.: *Hereditas* **30**, 429 (1944). — QUASTEL, J. H.: *Trans. Faraday Soc.* **39**, 348 (1943). — WOLL, E.: *Chromosoma* **5**, 391 (1953).

Dr. K. PETERS, Dr. H. LEHR, Tübingen, Univ.-Frauenklinik.

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. K. BINGOLD).

Die Wirkung des Oxyäthyl-Theophyllins auf die Nierenfunktion unter dem Einfluß von Hexamethoniumbromid.

Von
HANS SCHWALB.

(Eingegangen am 8. Dezember 1953.)

Es ist bekannt, daß die Tätigkeit der Nieren von den unter physiologischen Verhältnissen erfolgenden Änderungen des Herzminutenvolumens und des arteriellen Druckes kaum beeinflusst wird. Dies trifft jedoch unter der Wirkung vasoaktiver Stoffe nicht mehr zu, vor allem dann nicht, wenn sie bei einem bereits pathologisch veränderten Kreislauf, wie etwa bei der Hypertonie, zur Geltung kommt. So hat sich gezeigt, daß eine stärkere Senkung des Blutdrucks durch chemisch und pharmakologisch ganz unterschiedliche Substanzen meist auch zu einer Abnahme der Harnausscheidung führt.

Auch unter dem Einfluß von Hexamethoniumverbindungen, welche durch Hemmung vasomotorischer Impulse eine starke Blutdrucksenkung hervorrufen können, treten solche Veränderungen der Nierenfunktion und vor allem der renalen Hämodynamik ein (BLAINEY, MACKINON, HAUGEN u. BLEGEN, KUCHER u. STEINBEREITHNER). Wie wir aus eigenen Untersuchungen schließen müssen, handelt es sich dabei nicht um eine spezifische Wirkung des Hexamethoniums auf die Nierenfunktion. Wir haben beobachtet, daß jede unter der Einwirkung dieser Substanz erfolgende stärkere Abnahme des Herzminutenvolumens und des arteriellen Mitteldrucks mit einer etwa entsprechenden Verminderung des Nierenplasmastroms, der Glomerulusfiltration und der Harnausscheidung verbunden war, daß diese Veränderungen jedoch nicht bei gleichbleibendem arteriellen Druck auftraten (SCHIMMLER u. SCHWALB).

Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob sich die während einer Blutdrucksenkung nach Hexamethoniumbromid erfolgende Einschränkung der Nierentätigkeit durch ein anderes Pharmakon abschwächen oder aufheben läßt. Am ehesten war dies von den Xanthinderivaten, insbesondere von den Dimethyl-Xanthinen, zu erwarten, welche sowohl die Nierendurchblutung als auch das Glomerulusfiltrat und die Harnabsonderung zu steigern vermögen, den Blutdruck dagegen nur wenig beeinflussen. Selbst dann, wenn sich die Ganglienblockade durch Hexamethoniumbromid auch auf die nervöse Versorgung der Nieren auswirken sollte, müßten die Xanthinderivate wirksam bleiben, da ihr Angriffspunkt in der Niere jedenfalls peripher dem des Hexamethoniums liegt.

Während dieses die sympathische und parasympathische Erregungsübertragung auf die postganglionären Fasern hemmt, greifen die Xanthine bekanntlich an der Gefäßmuskulatur selbst an, in der Niere an den präglomerulären Arteriolen; unabhängig davon scheint ihnen auch eine direkte Beeinflussung der tubulären Rückresorption zuzukommen (siehe bei SCHWALB u. HENSEL).

Es wurde bei 16 Personen, Normotonikern und Hypertonikern, das Verhalten der Nierenfunktion unter der gleichzeitigen Wirkung von Hexamethoniumbromid und Theophyllin untersucht.

Methode.

Es wurden bestimmt:

1. Die Clearance der para-Aminohippursäure nach SMITH u. Mitarb.; bei einer konstanten Plasmakonzentration von $2-3 \text{ mg}\%$ para-Aminohippursäure entspricht sie dem Nierenplasmastrom. Zur Erzielung dieses konstanten und niedrigen Blutspiegels erhielt die Versuchsperson 1 g p-Aminohippursäure („Nephrotest“ Casella) i.v., nach 20 min eine Lösung von 2 g p-Aminohippursäure in 300 ml 5.7% Traubenzuckerlösung als i.v. Dauertropfinfusion, 25–30 Tropfen pro Minute.

2. Die Clearance des endogenen Kreatinin nach POPPER u. MANDEL; sie diente zur Beurteilung der Glomerulusfiltration.

3. Bei 10 Personen wurde außerdem die Chlorid- und Harnstoffausscheidung ebenfalls nach der Clearance-Methode untersucht. Die Bestimmung der Chloride erfolgte nach VOLHARD, die des Harnstoffs nach der Urease-Methode von CONWAY.

Versuchsanordnung.

Vor Beginn des Versuches erfolgte das Legen des Blasenverweilkatheters und die Blasenspülung. 30 min nach Beginn der i.v. Dauertropfinfusion wurde das erste Mal Venenblut abgenommen, weiterhin im Abstand von 20 min. Zur gleichen Zeit wurde jeweils der Harn entnommen. Nach meistens 2 Untersuchungsperioden von je 20 min wurde Hexamethoniumbromid („Gangliostat“ der Firma Pharmazell) i.m. injiziert. Wir haben in der Regel die i.v. Injektion von Theophyllin 20 min später vorgenommen, da erst zu diesem Zeitpunkt der Höhepunkt der Hexamethoniumwirkung zu erwarten war. Das Theophyllin wirkt dagegen nach eigenen Beobachtungen bereits 3 min nach der i.v. Injektion. In einigen Fällen wurden beide Stoffe auch gleichzeitig gegeben. Der Zeitpunkt der Injektionen sowie die jeweilige Dosis sind aus der Tabelle ersichtlich.

Als injizierbares Theophyllin verwendeten wir das Oxyäthyltheophyllin („Cor-dalin“, Chemiewerk Homburg). 0.226 g des Oxyäthyltheophyllin entsprechen 0.2 g Theophyllin.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle aufgeführt.

1. Eine Änderung der Nierenfunktion bereits in der ersten Versuchsperiode nach Injektion des Hexamethoniumbromids erfolgte bei 4 Fällen. Dabei war allerdings auch eine mehr oder weniger starke Senkung des vorher erhöhten Blutdrucks eingetreten. Am meisten nimmt hierbei die Kreatinin-Clearance ab, somit wahrscheinlich das Glomerulusfiltrat, entsprechend oder sogar relativ mehr auch die Harnmenge, die Chlorid- und

Harnstoffausscheidung (Versuch 1, 3, 4, 5); der Nierenplasmastrom verringert sich dabei nicht immer. Diese Veränderungen findet man bei nur geringer Drucksenkung zumindest schwächer ausgeprägt, sie fehlen völlig bei gleichbleibendem Blutdruck (Versuch 9, 10, 12, 16).

Ausnahmen davon machen Versuch 2, bei dem nach Hexamethonium trotz starker Blutdruckabnahme eine Steigerung der Nierentätigkeit erfolgt, in geringerem Maße auch bei Fall 13. Eine Person (11) verhielt sich auch bezüglich des Blutdrucks — verglichen mit allen anderen Versuchen völlig atypisch; es erfolgte nämlich nach Hexamethonium sogar eine allmähliche Steigerung des Blutdrucks. Bezeichnenderweise nahm dann auch das Glomerulusfiltrat und die Ausscheidung zu.

Bei Normotonikern wirkt sich die Blutdrucksenkung offenbar weniger auf die Nierenfunktion aus als bei Hypertonikern. So zeigt Fall 15 selbst bei kleinster Blutdruckamplitude und einem arteriellen Mitteldruck von 70 mm Hg fast gleichbleibende, jedenfalls noch im Bereich des Normalen liegende Werte für Plasmastrom, Filtrat und Ausscheidung.

Eine spezifische oder isolierte Wirkung des Hexamethoniums auf die Nierenfunktion ist somit in den meisten Versuchen nicht zu erkennen.

2. Das Oxyäthyl-Theophyllin bewirkt auf Grund zahlreicher Beobachtungen (HENSEL) bei alleiniger Anwendung häufig eine Zunahme des Nierenplasmastroms, der Filtration und der Harnausscheidung. Unter den 16 Versuchen trat auch hier bei 11 Fällen die typische Theophyllin-Wirkung, wenigstens auf einen dieser Faktoren, in Erscheinung: von den 5 Personen mit Hypertonie, bei denen nach Hexamethoniumbromid eine ausgeprägte Blutdrucksenkung eingetreten war, reagierten 3 auf Theophyllin; von den 5 Hypertonikern mit etwa gleichbleibendem Blutdruck waren es ebenfalls 3; von den übrigen 6 Fällen reagierten 5. Die Wirkung des Theophyllins zeigt sich manchmal nur in einer geringen Zunahme der Chlorid-Ausscheidung, so bei Versuch 1, 11, 15. In anderen Fällen wird auch der Plasmastrom und die Filtration (Versuch 3, 6, 8, 14, 16) und schließlich auch die Harnmenge vermehrt (Versuch 6, 7, 8, 12, 14, 16). Eindrucksvoll war der Theophyllin-Effekt besonders dann, wenn das Theophyllin und das Hexamethonium gleichzeitig gegeben werden (Fall 8, 14). Prinzipiell ist somit die Wirksamkeit von Theophyllin auch unter dem Einfluß von Hexamethoniumbromid möglich.

In der Versuchsgruppe der ausgeprägten Blutdrucksenkungen bei Hypertonien (Versuch 1–5) fällt auf, daß eine Diurese nach Oxyäthyl-Theophyllin nicht zustande kam. Es zeigte sich hier auch keine eindeutige Zunahme der Kreatinin-Clearance. Offensichtlich wirkt eine stärkere Abnahme des arteriellen Drucks einer optimalen Theophyllin-Wirkung entgegen; denn auch eine Steigerung des Nierenplasmastroms (Versuch 3 und eventuell auch 4) führt nicht mehr zu einer Diurese. Immerhin ist aber

auch eine Zunahme der Chlorid-Ausscheidung trotz stark erniedrigten Blutdrucks und gleichzeitigen Rückgangs der Plasmadurchströmung und Filtration noch möglich (Fall 1). Auch läßt sich beobachten, daß manchmal trotz anhaltender Blutdrucksenkung keine verwertbare Abnahme der Ausscheidungswerte erfolgt, wenn nach Hexamethoniumbromid noch Theophyllin gegeben wird.

Tritt bei Hypertonien nach Hexamethoniumbromid nur eine geringfügige oder keine Blutdrucksenkung ein (Versuch 6—10), dann kommt die Theophyllin-Wirkung teilweise deutlicher zur Geltung (Versuch 6, 7), sie kann jedoch auch hier fehlen (Versuch 9, 10). Das gleiche gilt für die Versuche, bei denen keine oder eine nur geringe Hypertonie bestand (Versuch 12—16). In einem Fall kam trotz Abnahme des Blutdrucks auf 105/90 eine erhebliche Diurese zustande, bei Versuch 15 trotz ausgesprochener Hypotonie noch eine Steigerung der Chlorid-Ausscheidung.

Diskussion.

Theophyllin vermag also auch während eines starken Blutdruckabfalles unter der Einwirkung von Hexamethoniumbromid die Nierenfunktion in typischer Weise zu beeinflussen; d. h. es sind dabei prinzipiell sämtliche Wirkungen möglich, die das Theophyllin auch bei alleiniger Anwendung hervorrufen kann, nämlich eine Steigerung der renalen Plasmadurchströmung, des Glomerulusfiltrats und insbesondere der Chlorid- und Wasserausscheidung. In $\frac{2}{3}$ unserer Versuche war ein Theophyllin-Effekt zu erkennen. Das ist aber der gleiche Prozentsatz, in dem wir auch bei alleiniger Theophyllin- oder Coffein-Anwendung eine Wirkung sahen (SCHWALB u. HENSEL, HENSEL). Man kann also das Ausbleiben der Theophyllin-Wirkung in dem einen oder anderen Fall nicht unbedingt mit dem gleichzeitigen Einwirken des Hexamethoniumbromids oder mit der Blutdrucksenkung in Zusammenhang bringen.

Dagegen gewinnt man den Eindruck, daß die Theophyllin-Wirkung gerade bei Hypertonikern während einer stärkeren Blutdruckabnahme nicht in demselben Grade in Erscheinung tritt, als es unter gleichbleibenden Blutdruckwerten beobachtet wird. Das gilt besonders für Hypertonien mit bereits eingeschränkter Nierendurchblutung und Nephrosklerose. Es überrascht nicht, daß Normotoniker auf Theophyllin eindrucksvoller reagieren. Denn allein die Blutdrucksenkung nach Hexamethoniumbromid wirkt sich bei Hypertonikern, besonders wenn sie bereits eine verminderte Nierendurchblutung aufweisen, viel intensiver auf die Nierenfunktion aus als es bei Normotonikern der Fall ist. Aber auch dann, wenn hierbei die typischen Theophyllin-Effekte nicht im Sinne einer Steigerung der Nierentätigkeit in Erscheinung treten, so wird diese zum Teil nicht in dem Ausmaße verringert, wie wir es bei alleiniger Anwendung von Hexamethoniumbromid gesehen haben.

An Hand vergleichender Untersuchungen zwischen Kreislauf und Nierenfunktion haben wir angenommen, daß sich die nach Hexamethoniumbromid einstellende Verminderung der Nierendurchblutung und der Filtration durch die gleichzeitige Abnahme des Herzminutenvolumens und des arteriellen Mitteldrucks ausreichend erklären läßt. Es würde sich somit bei den Veränderungen der renalen Hämodynamik um einen sekundären Vorgang handeln, wie er sich auch in peripheren Kreislaufbezirken abspielt. Dafür spricht die Tatsache, daß die unter Hexamethoniumbromid mögliche Steigerung der peripheren Durchblutung durch die Blutdrucksenkung abgeschwächt bzw. verhindert wird.

Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß unter entsprechenden Voraussetzungen die ganglienblockierende Wirkung des Hexamethoniumbromids auch auf die nervale Beeinflussung der Nieren übergreifen kann. So ist vielleicht die selten zu beobachtende Steigerung der Nierendurchblutung nach Hexamethoniumbromid damit zu erklären, daß ein bestehender nerval ausgelöster Spasmus der präglomerulären Arteriolen durch Blockierung der vasoconstrictorischen Erregungsübertragung beseitigt wird. Immerhin läßt sich auch mit ähnlich wirkenden Substanzen, z. B. mit Tetraäthylammonium die Ischämie der Nieren nach Splanchnicusreizung verhindern. Eine derartige Vermehrung der Nierendurchblutung nach Ganglienblockierung würde allerdings voraussetzen, daß die Nierengefäße vorher unter dem Einfluß eines erhöhten Sympathicotonus gestanden haben. Bei der weit überwiegenden Mehrzahl unserer Versuche lassen sich jedoch ähnliche Vorgänge nicht annehmen.

In diesem Zusammenhang ist der Mechanismus der Theophyllin-Wirkung auf die renale Hämodynamik so zu erklären, daß die bei der Blutdrucksenkung nach Hexamethonium eintretenden Kreislaufveränderungen an der Niere nicht mehr oder weniger zur Geltung kommen. Die Verminderung der Nierendurchblutung kann durch eine Erweiterung der Arteriolen abgeschwächt oder aufgehoben werden, wozu das Theophyllin durch einen direkten Angriffspunkt an der Gefäßmuskulatur peripher der Nervenendigungen befähigt ist. Bekanntlich bewirken Xanthinderivate eine Zunahme der Nierendurchblutung auch an der entnervten Niere (LOEWY, FLETSCHER u. HENDERSON). Aber selbst eine Erweiterung der präglomerulären Arteriolen wird sich bei gleichzeitiger stärkerer Senkung des Blutdrucks nicht mehr in einer Zunahme der Glomerulusfiltration auswirken können. Damit ist aber ein Faktor ausgeschaltet, der für das Zustandekommen der Theophyllin-Diurese von Bedeutung ist. Es bleibt jedoch auch unabhängig davon noch die Möglichkeit einer spezifischen Beeinflussung der tubulären Rückresorption, die sich vor allem in einer Mehrausscheidung der Chloride äußert.

Tabelle 1.

Effektiver Plasmastrom, Glomerulusfiltrat, Wasser-, Chlorid- und Harnstoff-ausscheidung nach Injektion von Hexamethoniumbromid und Oxyäthyl-Theophyllin.

Name, Geschlecht, Alter, Nr.	RR	HV	C _k	C _p	C _{Cl}	C _U	Dosis
1. Se.w.46 I	265/150	1,60	84	256	0,63	47	50 mg C ₆ 0,2 g Th
II	250/150	4,25	98	176	0,69	52	
III	211/138	2,25	71	274	0,37	41	
IV	210/145	1,60	74	117	0,91	34	
2. Kn.m.56 I	260/165	5,90	43	154	5,87	34	25 mg C ₆ 0,2 g Th
II	270/165	7,05	43	175	5,86	33	
III	180/125	9,75	78	317	7,29	48	
IV	185/135	2,90	73	287	2,79	34	
3. Ne.m.46 I	230/140	1,72	135	354			20 mg C ₆ 20 mg C ₆ und 0,2 g Th
II	200/140	1,25	99	353			
III	195/140	1,34	109	422			
4. Ma.w.63 I	225/100	1,45	96	292			20 mg C ₆ 0,2 g Th
II	230/105	2,27	83	307			
III	185/ 85	2,45	72	270			
IV	190/ 85	2,2	81	303			
5. Wo.w.58 I	210/130	5,71	74	358	1,59	44	25 mg C ₆ 10 mg C ₆ , 0,2 g Th
II	210/135	2,9	79	375	1,96	46	
III	175/115	1,83	69	335	0,86	37	
IV	175/110	1,26	73	330	0,86	29	
6. Hi.w.47 I	190/125	4,25	57	352			30 mg C ₆ 20 mg C ₆ , 0,2 g Th
II	180/125	1,38	61	348			
III	170/125	6,13	81	481			
7. Je.w.48 I	185/110	10,2	56	197	3,12	41	25 mg C ₆ 0,2 g Th
II	180/110	5,50	46	162	2,0	34	
III	165/115	3,5	51	191	1,48	38	
IV	160/120	6,4	62	187	2,17	43	
8. Wo.w.58 I	210/130	5,43	79	293	0,97	36	25 mg C ₆ , 0,2 g Th
II	200/130	2,30	71	363	0,84	32	
III	185/135	3,85	95	298	1,49	41	
IV	180/140	1,0	50	152	0,37	17	
9. Sz.w.31 I	200/130	4,6	87	322	0,71	41	30 mg C ₆ 0,2 g Th
II	200/130	3,05	83	313	0,6	40	
III	195/130	2,35	87	298	0,58	40	
IV	215/140	2,8	82	280	0,77	39	
10. Tu.m.44 I	190/130	3,78	107	407			20 mg C ₆ 0,2 g Th
II	190/130	3,0	117	411			
III	180/130	3,48	118	424			

Tabelle 1 (Fortsetzung.)

Name, Geschlecht, Alter, Nr.	RR	HV	C _k	C _p	C _{Cl}	C _U	Dosis
11. Ko.m.27 I	160/ 90	16,4	95	608	2,03	92	15 mg C ₆ 0,2 g Th
II	155/ 90	4,54	94	567	2,38	76	
III	155/ 90	11,3	107	567	4,35	97	
IV	180/ 95	7,69	104	504	5,27	87	
12. Ha.w.19 I	145/115	8,55	128	481	2,8	88	20 mg C ₆ 0,2 g Th
II	145/115	6,8	134	510	2,9	88	
III	140/115	4,33	127	513	2,96	81	
IV	145/115	6,33	133	570	3,56	90	
13. Se.w.31 I	150/120	2,56	77	236			20 mg C ₆ 0,2 g Th
II	130/110	3,73	87	300			
III	135/110	2,43	71	269			
14. El.m.48 I	130/100	8,65	96	378			20 mg C ₆ und 0,2 g Th 20 mg C ₆
II	130/100	3,95	94	356			
III	105/ 90	9,63	101	401			
IV	110/ 95	4,8	82	317			
15. Jä.m.44 I	105/ 75	4,62	140	678	1,43	81	20 mg C ₆ 0,2 g Th
II	105/ 75	7,85	150	755	1,50	82	
III	80/ 65	3,09	120	625	1,36	54	
IV	90/ 55	2,00	106	550	1,93	64	
16. Sch.w.24 I	125/ 95	1,4	80	563	—		40 mg C ₆ 0,2 g Th
II	125/100	3,81	70	476	0,22		
III	125/100	3,05	82	581	0,33		
IV	125/105	12,8	98	667	1,16		

Zeichenerklärung: RR — Blutdruck nach RIVA-ROCCI in mm Hg; HV — Harnvolumen cm³/min; C_K — Clearance des endogenen Kreatinin in cm³/min — Glomerulusfiltrat; C_p — Clearance der para-Aminohippursäure in cm³/min = effektiver Nierenplasmastrom; C_{Cl} — Chlorid-Clearance in cm³/min; C_U — Harnstoffclearance in cm³/min. Die Zahlen I–IV bezeichnen die einzelnen Versuchsperioden über jeweils 20 min. Der Zeitpunkt der Injektionen von Hexamethoniumbromid (hier durch C₆ bezeichnet) und von Oxyäthyltheophyllin (Th) und deren Dosis ist für jeden einzelnen Versuch gesondert angegeben. 0,226 g Oxyäthyltheophyllin = 0,2 g Theophyllin.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung des Oxyäthyltheophyllin auf die Nierenfunktion unter dem gleichzeitigen Einfluß des Hexamethoniumbromid bei 16 Personen mit normalem und erhöhtem Blutdruck untersucht. Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurde gleichzeitig die Clearance der para-Aminohippursäure, des endogenen Kreatinin und zum Teil auch der Chloride und des Harnstoffs bestimmt.

Prinzipiell ist das Oxyäthyltheophyllin auch während des Einflusses von Hexamethoniumbromid wirksam. Dies läßt sich auch nach starker Blutdrucksenkung durch Hexamethoniumbromid feststellen, beim Normotoniker in einem größeren Ausmaß als beim Hypertoniker mit bereits eingeschränkter Nierendurchblutung. Der Mechanismus der Theophyllinwirkung in Abhängigkeit von den nach Hexamethoniumbromid auftretenden Kreislaufveränderungen wird erörtert.

Literatur.

BLAINEY, I. D.: *Lancet* I, **1952**, 993. — HAUGEN, H. N., and E. M. BLEGEN: *Scand. J. clin. Laborat. Investig.* **5**, 58 (1953). — HENSEL, H.: in Vorbereitung. — LOEWI, O., W. M. FLETSCHER u. V. E. HENDERSON: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **53**, 15 (1905). — MACKINNON, J.: *Lancet* II, **1952**, 12. — POPPER, H., u. E. MANDEL: *Erg. inn. Med.* **53**, 685 (1937). — *Z. Biochem.* **291**, 354 (1937). — SCHIMMLER, W., u. H. SCHWALB: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **221**, 177 (1954). — SCHÖNBAUER, L., R. KUCHER u. K. STEINBEREITHNER: *Wien. med. Wschr.* **103**, 185 (1953). — SCHWALB, H., u. H. HENSEL: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **221**, 198 (1954). — SMITH, H. W., u. N. FINKELSTEIN: *J. clin. Invest.* **24**, 388 (1945).

Dr. HANS SCHWALB, I. Med. Univ.-Klinik München.

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. G. v. BERGMANN).

Die Wirkung von Histamin-Injektionen in die Arteria renalis im Hinblick auf die Masugi-Nephritis* **.

Von

HANSHEINER ILLIG, CHRISTEL MAUTHE und ERWIN MÜLLER.

(Eingegangen am 7. Dezember 1953.)

Allergische Reaktionen können im Tierversuch eine diffuse Glomerulonephritis verursachen (MASUGI). Einen Zusammenhang zwischen Allergie und postscarlatinöser Nephritis hatte schon SCHIECK vermutet, doch erst Forschungsergebnisse der beiden letzten Dezennien haben die große Rolle des Faktors Anaphylaxie in der Pathogenese der Glomerulonephritis aufgedeckt. Über die vielen experimentellen Möglichkeiten, eine Nephritis zu erzeugen, gibt REUBI einen Überblick. Beim Menschen ist wohl meist eine „Infektallergie“ die Ursache der Erkrankung (LETTE-
RER). So kommt es — bei charakteristischer Anamnese — 5 bis 20 Tage nach einer eitrigen Angina etc. zum Ausbruch der Nierenerkrankung.

Die Glomerulonephritis ist als allergischer Vorgang Folge einer Antigen-Antikörperreaktion, die sich im Glomerulus abspielt (SARRE). Dort konzentrieren sich nämlich die Antikörper, wie PRESSMANN u. Mitarb. durch Isotopenmarkierung feststellen konnten. Nach Untersuchungen von DALE, LAIDLAW und BUCHER wird bei der Antigen-Antikörperreaktion Histamin freigesetzt. Dieses „anaphylaktogene“ Histamin soll dann — neben anderen Stoffen — die eigentliche Ursache der anaphylaktischen Veränderungen sein (DALE, GUGGENHEIM). Aus diesem Grund schien es uns von Interesse, die Wirkungen des Histamins auf die Nierenstruktur im Tierexperiment zu untersuchen.

Bisher sind darüber nur wenige Beobachtungen bekannt geworden. HASHIMOTO fand in Hundenieren — 7 Tage nachdem die Tiere einen Histaminschock durchgemacht hatten — diffuse degenerative Veränderungen an den Tubuli. Die Glomeruli waren histologisch nicht verändert.

Bei Versuchen an der isolierten Niere konnte DICKER bei der Durchströmung mit Histamin eine gesteigerte Durchlässigkeit der Nierengefäße feststellen. Es kam zu einer Flüssigkeitsverminderung in der Nierenvene mit gleichzeitiger Herabsetzung des Uringehaltes. DICKER glaubte, daß Histamin in der Niere zu einem perivaskulären Ödem führt, durch welches die Nierengefäße komprimiert werden.

* Wir danken Herrn Prof. WERLE für die Einräumung eines Arbeitsplatzes im Wiss. Labor. d. Chirurg. Univ.-Klinik München.

** Herrn Prof. Dr. GUSTAV VON BERGMANN zum 75. Geburtstag.

FARKAS u. SZASZ untersuchten den Nierenkreislauf nach i.v. Histamingaben. Ebenso wie CORELLI, der das Histamin i.v. in die Bauchaorta und intrarenal gab, fanden sie eine kurzdauernde Anämie der Niere. Sie erklärten diese durch Öffnung arterio-venöser Anastomosen in iuxtamedullären Glomeruli. CORELLI dagegen zieht zur Erklärung der bis zu 30 sec dauernden Ischämie die verengernde Wirkung des Histamins auf das Arteriennetz der Niere heran.

Versuche über eine Zufuhr des Histamins durch die Nierenarterie sind uns bisher noch nicht bekannt geworden. Dies ist aber wohl die wirksamste Methode um den Einfluß des Histamins auf die Niere zu untersuchen. Bis bei einer intravenösen Injektion das Histamin in die Niere gelangen könnte, hat sich der Stoff so verteilt, daß bei dem hohen Histaminasegehalt der Niere (GUGGENHEIM) ein direkter Effekt kaum mehr erwartet werden kann. Der große Histaminasegehalt der Niere erschwert überhaupt derartige Versuche. Um einen Effekt zu erzielen, müssen hohe Histamindosen sehr rasch injiziert werden. Dabei gerät man aber in den Bereich der Dosis letalis, d. h. die Tiere sterben im Histaminschock. Dies könnte vermieden werden, wenn durch gleichzeitige Infusion einer bestimmten Menge von Histaminase in die Nierenvene die Histaminwirkung lokalisiert würde. Wir haben einen solchen Versuch beim Kaninchen vorgenommen, während die einfache intraarterielle Histamin-Injektion am Meerschweinchen durchgeführt wurde¹: Wegen der kleinen und leicht verletzlichen Gefäße ließ sich hier die kompliziertere Versuchsanordnung nicht durchführen. Bei einigen Tieren haben wir zum Vergleich Histamin direkt ins Nierenparenchym injiziert, einer weiteren Vergleichsgruppe gaben wir anstelle des Histamins Tyrodelösung in die Nierenarterie.

Die Versuche am Meerschweinchen wurden in folgender Weise durchgeführt: Nach Äthernarkose — dabei muß allerdings eine eventuelle Modifikation der allgemeinen Histaminwirkung in Kauf genommen werden (GUGGENHEIM) — erfolgte die transperitoneale Freilegung der li. Niere von einem Bogenschnitt im li. Mesogastrium aus. Nach stumpfer Präparation des Nierenhilus — was sich bei vermehrtem Fettgewebe oft recht schwierig gestaltete — lag zunächst die V. renalis als relativ großes, braunrotes Gefäß vor. Beim weiteren Vordringen konnte dann die A. renalis als bedeutend kleineres, weißlich schimmerndes, dorsal und meist cranial der Vene ziehendes Gefäß dargestellt werden. Mit einer dünnen Kanüle wurde dann eine entsprechende Menge Histamin injiziert. Beim Herausziehen der Nadel kam es aus dem zarten, leicht verletzlichen Gefäß immer zu einer Blutung, die durch sofortige, kurzdauernde Kompression gestillt wurde. Abschließend wurde das Abdomen schichtweise verschlossen. In gleicher Weise wurde bei den Meerschweinchen vorgegangen, die das Histamin intrarenal injiziert erhielten. Über die verwendete Histaminmenge und die Zahl der Versuche orientiert Tab. 1. Die histologischen Ergebnisse waren so eindeutig, daß wir auf eine weitere Ausdehnung der Versuche verzichten konnten. Aus Tab. 1 ist auch ersichtlich, wieviele Tiere im Histaminschock (meist 10 min nach der Injektion) zugrunde gingen. Die Dosis letalis von

¹ Es wurde das Histaminpräparat Imido — Roche und das histaminasehaltige Torantil von Hoechst verwendet. Für die Überlassung der Versuchsmengen haben wir beiden Firmen zu danken.

Histamin beträgt beim Meerschweinchen 3,5—10 mg/kg bei subcutaner und 0,3 bis 0,4 mg/kg bei i.v. Zufuhr (SCHMIDT u. STÄHELIN).

Die Nieren wurden sofort nach dem Exitus entnommen. Die überlebenden Tiere wurden 8—12 Tage nach der Operation getötet, wobei wieder darauf geachtet wurde, die Nieren so rasch wie möglich in die Fixierflüssigkeit zu bringen. In jedem Fall wurden beide Nieren histologisch untersucht, um eine weitere Vergleichsmöglichkeit zu haben.

Tabelle 1. Übersicht über die Versuche am Meerschweinchen.

Injektionsweise	Histaminmenge in gamma	Zahl der Versuche	davon tödlicher Histaminshock
intraarteriell	1000	1	1
intraarteriell	500	1	1
intraarteriell	200	3	2
intraarteriell	100	3	0
intrarenal	200	1	0
intrarenal	100	1	0
intrarenal	50	1	0
intraarteriell	Tyrolerlösung	2 ¹	

¹ Davon starb 1 Tier 10 min nach der Injektion im Operationsschock.

Die makroskopischen Befunde bei der Sektion der Meerschweinchen waren sehr gering. Dreimal konnte eine geringe einseitige Nierenvergrößerung festgestellt werden, die aber in einem Fall die nichtinjizierte rechte Niere betraf. Ebenso verhielt es sich mit der bei 3 anderen Versuchstieren vorhandenen Anämie der Nieren. Diese Befunde sind daher nicht mit Sicherheit auf unsere Versuche zurückzuführen.

Eindeutig waren dagegen die histologischen Ergebnisse unserer Versuchsreihe. Bei allen Tieren, die nach intraarterieller Injektion in Histaminshock ad exitum gekommen waren, fand sich eine stark ausgeprägte prästatische Hyperämie. Diese Blutfülle betraf in jedem Fall die Glomerulusschlingen, die Rinden- und Markcapillaren sowie auch die größeren Gefäße. Kennzeichnend waren auch fleckförmige Blutungs-herde, die vor allem an der Rinden-Markgrenze bestanden. Ein Einbruch des Blutes in das Harnsystem — im Sinne einer Hämaturie — konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Immer bezogen sich diese Veränderungen auf *beide* Nieren, nie war ein Seitenunterschied erkennbar. Bei der Hälfte dieser Tiere zeigte sich außerdem eine Weitstellung der Tubuli im Cortex corticis mit niedrigem Epithel, ein Befund, der bei den anderen Versuchsgruppen nicht in diesem Ausmaß zu erheben war. Bis auf einzelne hyaline Zylinder, die in jeder Versuchsgruppe zu finden waren, ergab die histologische Untersuchung des tubulären Apparates keinen pathologischen Befund.

Ebenso einheitlich waren die histologischen Bilder bei den übrigen Versuchsgruppen, ganz gleich, ob die einzelnen Tiere die intraarterielle oder intrarenale Histamin-Injektion überlebt hatten oder ob sie als Vergleich mit Tyrodelösung behandelt worden waren. Die Blutfülle war hier bei allen Schnitten eher gering. Proliferative Veränderungen an den Glomeruli oder Einlagerungen in die BOWMANsche Kapsel fanden sich nicht, der tubuläre Apparat schien unverändert. In wenigen Fällen waren kleine interstitielle Rundzelleninfiltrate in der rechten oder linken Niere vorhanden.

Anhangsweise seien die Ergebnisse des Dauerversuchs am Kaninchen angeführt. Wir injizierten hier schubweise in 15—30 min Abstand insgesamt 17 mg innerhalb von 2 Std in die li. Nierenarterie und gleichzeitig insgesamt 10 Einheiten Torantil in die li. Nierenvene (1 Einheit Torantil entgiftet binnen 24 Std bei 37° 1 mg Histamin). Nach Abschluß des Versuches wurde das Tier durch Äther i.v. getötet. Bei der Sektion zeigte sich die li. Niere deutlich geschwellt und hyperämisch. Auch mikroskopisch zeigte sich ein Unterschied: auf der Seite der Infusion bestand eine hochgradige Hyperämie des Markes mit großen Blutungsherden an der Rinden-Markgrenze, auf der anderen Seite beschränkte sich die geringere Hyperämie auf die Rinden-Markgrenze. Dieser Versuch scheint uns nicht wegen des Ergebnisses erwähnenswert, ein Einzelversuch kann dafür nie genügen, sondern aus methodischen Gründen. Mit Hilfe der gleichzeitigen Histaminase-Injektion in die Vene eines Organes während arterieller Histaminzufuhr, scheint es möglich zu sein, die Reaktion des ganzen Organismus in gewissem Ausmaß hintanzuhalten und isoliert das Verhalten des Einzelorgans *in vivo* untersuchen zu können. Zu einem späteren Zeitpunkt sollen diese Versuche weitergeführt werden.

Nach Histamingabe kam es bei unseren Versuchen nur dann zu Nierenveränderungen, wenn die Meerschweinchen nach intraarterieller Injektion im Histaminshock zugrunde gingen. Es fanden sich dann in *beiden* Nieren prästatische Veränderungen, als Folge der Kreislaufveränderungen des ganzen Organismus im Histaminshock (das im Operationsshock nach intraarterieller Injektion von Tyrodelösung gestorbene Tier zeigte keine derartigen Veränderungen). Kam es nicht zum tödlichen Histaminshock, ließen die Nieren keinerlei pathologische Veränderungen erkennen. In *keinem* Fall konnten wir also einen auf die injizierte Niere beschränkten, *lokalisierten* Histamineffekt nachweisen. Eine allgemeine Veränderung der Organe im Histaminshock ist zu erwarten. Unseres Erachtens ist es aber auch nicht erstaunlich, daß in den übrigen Versuchen die Nierenstruktur nicht beeinflußt wurde: Die Niere enthält von allen Organen am meisten Histaminase (GUGGENHEIM). Wenn daher die Histaminzufuhr auf gewisse Mengen beschränkt wird, kann alles Histamin entgiftet werden. Ein Effekt bleibt dann natürlich aus.

Übertragen wir unsere Ergebnisse auf die einleitenden Überlegungen. Wir führten dort Versuche an, die es zumindest sehr wahrscheinlich machen, daß die Glomerulonephritis eine Folge von Antigen-Antikörperreaktionen sei, die sich in der Niere abspielen. Wir führten weiter an, daß

das bei dieser Reaktion freiwerdende Histamin als Ursache der anaphylaktischen Veränderungen, hier also der Zellproliferation im Glomerulus usw., angesprochen wird. Diese Bedeutung des Histamins scheint nach den Ergebnissen unserer Versuche fraglich. Obwohl das Histamin auf dem experimentell wohl kürzest möglichen Weg in hoher Konzentration an die Glomeruli herangeführt wurde, kam es in keinem Fall zu Erscheinungen im Sinne einer Glomerulitis oder deren Vorstufen.

Auch bei der experimentellen Nephritis läuft die Antigen-Antikörperreaktion und damit die Histaminfreisetzung in kurzer Zeit ab. Es genügt nämlich — wie SARRE u. WIRTZ gezeigt haben — wenn die Arteria renalis nach der Antigenezufuhr 15 min lang abgeklemmt bleibt, um in der Niere eine Glomerulonephritis zu verhüten. In dieser Hinsicht kann dieser Vorgang also etwa mit unserer Methode der Histaminzufuhr verglichen werden. Das „anaphylaktogene“ Histamin müßte dann zum Shock führen oder die freigewordene Menge bleibt unerschwellig und damit, wie unsere Versuche zeigten, ohne Einfluß auf die Nierenstruktur. Da BUCHER zeigen konnte, daß in der Meerschweinchenniere während der Antigen-Antikörperreaktion maximal 0,065 gamma Histamin pro Gramm Nierengewicht freigesetzt werden, ist das letztere wohl immer der Fall. Auch die Wiederholung der Antigenezufuhr wird die Histaminwirkung kaum steigern können, denn wiederholte Histamingaben führen rasch zu einer Gewöhnung (EICHLER, KARADY u. BENTSATH).

Eine maßgebliche Rolle des Histamins bei der Entstehung der MASUGI-Nephritis scheint nach allem schwer denkbar. Zur selben Folge-
rung kam FRIEBEL in Bezug auf das Asthma von Meerschweinchen. Er begründet seine Einstellung mit dem unterschiedlichen Effekt von Histamin- bzw. Antigen-Aerosolen. Trotzdem glauben wir, daß damit die allergische Genese der experimentellen Nephritis und des Asthmas keineswegs unwahrscheinlich geworden ist. Wir möchten annehmen, daß das *Histamin* nur die *Rolle eines Indicators für Antigen-Antikörperreaktionen* spielt. Vielleicht mag es sekundär auf die entstehenden Veränderungen verstärkend wirken, wofür Untersuchungen von BENZ u. SEYBOLD sprechen könnten.

Zusammenfassung.

1. Bei Histamin-Injektionen in die Arteria renalis, die einen tödlichen Shock auslösen, kommt es histologisch in *beiden* Nieren zum Bild einer prästatistischen Hyperämie.

2. Tiere, die eine einseitige intraarterielle oder intrarenale Histamin-Injektion überleben, lassen nach 8—12 Tagen histologisch keine Veränderung der Nierenstruktur erkennen.

3. Aus diesen Ergebnissen wird im Zusammenhang mit Untersuchungen anderer Autoren gefolgert, daß dem Histamin mit großer Wahr-

scheinlichkeit bei der Entstehung der MASUGI-Nephritis keine maßgebliche Bedeutung zukommt.

4. Die allergische Genese des Krankheitsbildes wird aber dadurch nicht unwahrscheinlich gemacht.

Literatur.

BENZ, H., u. G. SEYBOLD: *Ärztl. Forsch.* **5**, I, 205 (1951). — BUCHER, J., u. K. BUCHER: *Internat. Arch. Allergy u. appl. Immunol., Suppl. ad Vol. III.* — CORELLI, D.: *Schweiz. med. Wschr.* **1950**, 552. — DALE, H. H.: *Brit. Med. J.* II, 168 (1948). — *Acta allergol. (Kopenh.)* **5**, 151 (1952). — DALE, H. H., u. LAIDLAW: *J. of Physiol.* **52**, 355 (1918). — DICKER, E.: *C. r. Soc. Biol. (Paris)* **99**, 341 (1928). — EICHLER u. a.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **159**, 606 (1931). — FARKAS, K., u. G. SZASZ: *Virchows Arch.* **317**, 342 (1949). — FRIEBEL, H.: *Histamin und anaphylaktischer Shock. I. Beiheft d. Z. f. Aerosolforsch.* Stuttgart 1953. — GUGGENHEIM, M.: *Die biogenen Amine.* 4. Aufl. Basel 1951. — HASHIMOTO: *J. of Pharmacol.* **25**, 381 (1923). — KARADY u. BENTSATH: *Z. exper. Med.* **100**, 48 (1937). — LETTERER, E.: *Dtsch. med. Wschr.* **1953**, 512. — MASUGI, M.: *Beitr. path. Anat.* **32**, 429 (1934). — *Klin. Wschr.* **1935**, 373. — PRESSMANN, D., u. a.: *Science (Lancaster, Pa.)* **109**, 63 (1949). — RUEBI, F.: *Praxis (Bern)* **1951**, 772. — SARRE, H.: *Dtsch. med. Wschr.* **1952**, 1158. — SARRE, H., u. WIRTZ: *Dtsch. Arch. klin. Med.* **189**, 1 (1942). — SCHIECK, B.: *Jb. Kinderheilk.* **65**, 000 (1907). — SCHMIDT u. STÄHELIN: *Z. Immunforsch.* **60**, 222 (1929).

Dr. H. ILLIG, z. Zt. Mercer Hospital, Trenton 8, N. J. USA.

Dr. E. MÜLLER, München, Maximilianstraße 9.

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie Madrid
(Prof. MARAÑÓN).

Über den Einfluß der experimentellen Blockierung des reticulo-endothelialen Systems mittels Trypanblau und Eisensaccharat auf die Anoxämie-Resistenz der Ratte.

Von

J. L. ARTETA und J. R. PUCHOL.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Dezember 1953.)

Wir verfügen über Informationen hinsichtlich der Reaktion des reticulo-endothelialen Systems (R.E.S.) im Zustand des allgemeinen Adaptation-Syndroms (G.A.S., General Adaptation Syndrome).

Während der Alarmreaktion (A.R.) steigt die Absorptionsfähigkeit der Zellen, die diesem organischen System angehören. Dieser Tatbestand geht vor allen Dingen aus den Beobachtungen von UOTILA u. PEKKARINEN sowie aus den Arbeiten von JAMES und seinen Mitarbeitern hervor. Die experimentell in der Ratte hervorgerufene Alarmreaktion ist von einer gesteigerten Deponierung von Partikeln injizierter chinesischer Tusche in den Zellen des R.E.S. hergeleitet^{3b, 6}.

Auf der anderen Seite existieren in der Literatur sehr wenig Daten bezüglich des Einflusses des R.E.S. auf das G.A.S. Wir wissen außerordentlich wenig über die Art, in welcher experimentelle Modifikationen der Aktivität dieses organischen Systems das G.A.S. beeinflussen können.

Diese Arbeit soll die Ergebnisse über die Modifikationen aufzeigen, welche die Blockierung des R.E.S. in der Reaktionslage des Organismus während einer durch Hypoxämie provozierten Alarmreaktion hervorruft.

Methoden.

Wir haben uns weißer Ratten bedient, deren Gewicht zwischen 110 und 140 g lag. Sie wurden mit einer aus Brot, Milch und Mais zubereiteten Diät ad libitum ernährt und erhielten zusätzlich einmal pro Woche frische Mohrrüben. In den verschiedenen Gruppen wurden proportional gleichviel männliche und weibliche Tiere verwandt.

Die Hypoxämie-Experimente wurden mit einem Apparat analog dem von R. H. HOUSSAY durchgeführt: Die Ratten wurden in einen großen Glasbehälter eingeschlossen, der mit einer Ölvakuumpumpe mit Manometer verbunden war; die Verbindung zur Außenatmosphäre wurde durch 3 mit eingeschlifften Glasstopfen versehenen Glasröhren hergestellt, von denen eines am Ende ein Stück

Gummischlauch mit Schlauchklemme trug, durch die der Lufteintritt geregelt und der gewünschte Unterdruck konstant gehalten werden konnte. Die Dekompression dauerte 90 min und erreichte in 4—6 min bei einer gleichzeitigen Temperatur von 20—22° ihre festgesetzte Grenze. Die Ratten wurden 2 Std vor dem Hypoxämie-Experiment in den Raum gebracht, in dem sich auch der Dekompressionsapparat befand, um den Einfluß der Temperaturänderung auf die Anoxämie-Resistenz auf ein Minimum zu reduzieren.

Zur R.E.S.-Blockierung wurde eine 1%ige, in physiologischem Medium hergestellte Trypanblaulösung verwandt und außerdem eine 25%ige Eisensaccharatlösung in destilliertem Wasser. Die Trypanblaulösung wurde heiß präpariert und nach Abkühlung filtriert; sie wurde stets frisch bereitet, um die Toxizität zu vermeiden, die alten Lösungen eigen ist.

Beide Substanzen wurden i.v. injiziert, und zwar 1 ml der Trypanblau- und 1,5 ml der Eisensaccharatlösung.

Für die Blutausstriche wurde das Blut den Schwanzgefäßen durch Schnitt und ohne vorhergehende Anästhesie entnommen und mit MAY-GRÜNWARD-GIEMSA gefärbt. Die Auszählungen wurden mit kontrastierten Pipetten und der FUCHS-ROSENTHAL-Kammer durchgeführt.

Die Nebennieren wurden unmittelbar nach dem Tode herausgenommen und in 20%iger Formollösung fixiert. Zum Schneiden wurde ein Vereisungsmikrotom verwandt und die Schnitte mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Zur Färbung der Lipide kamen Sudan III und Sudan Black B zur Anwendung.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Resultate sind in der Tab. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1.

Mortalitätsziffern der mit Trypanblau- und Eisensaccharatlösung injizierten Ratten bei einer 90 min währenden Dekompression von 200 mm Quecksilber; Eintritt der Dekompression binnen 4—6 min.

Anzahl der Ratten	Geschlecht		Injizierte Substanz	Dosis	Via	Nach der Injektion verstrichene Zeit (min)	% Mortalität 90 min, bei 200 mm Hg
	♂	♀					
T. 52	12	40	Trypanblau	1 ml	i.v.	0	56
P. 27	6	21					56
P. 28	26	22					39
P. 28	6	22					25
P. 28	6	22					57
P. 28	6	22					57
P. 30	8	22	Eisen-saccharat	2 ml	i.v.	120	27

T. = Kontrolltiere; P. = Versuchstiere; Konzentration des Trypanblau: 1%; Konzentration des Eisensaccharats: 25%; i.v. — intravenös; Pe — intraperitoneal.

Verschiedene Gruppen von Ratten wurde 1 ml einer 1%igen Trypanblaulösung i.v. appliziert. Danach wurden sie innerhalb verschiedener Zeitabstände bei 20—22° dem Hypoxämie-Experiment unterworfen.

Diejenigen Ratten, die unmittelbar nach der Trypanblau-Injektion dekomprimiert wurden, zeigten die gleiche Mortalitätsrate wie die Kontrolltiere. Ein analoges Verhalten wurde bei den mit Eisensaccharatlösung injizierten Ratten beobachtet.

30 min vor der Dekompression injizierte Ratten zeigten gegenüber den Kontrolltieren eine gewisse, wenn auch schwache Resistenz gegen Anoxämie.

Den höchsten Resistenzgrad wiesen jene Tiere auf, die der Anoxämieprobe 120 min nach der Eisensaccharat- oder Trypanblauinjektion unter-

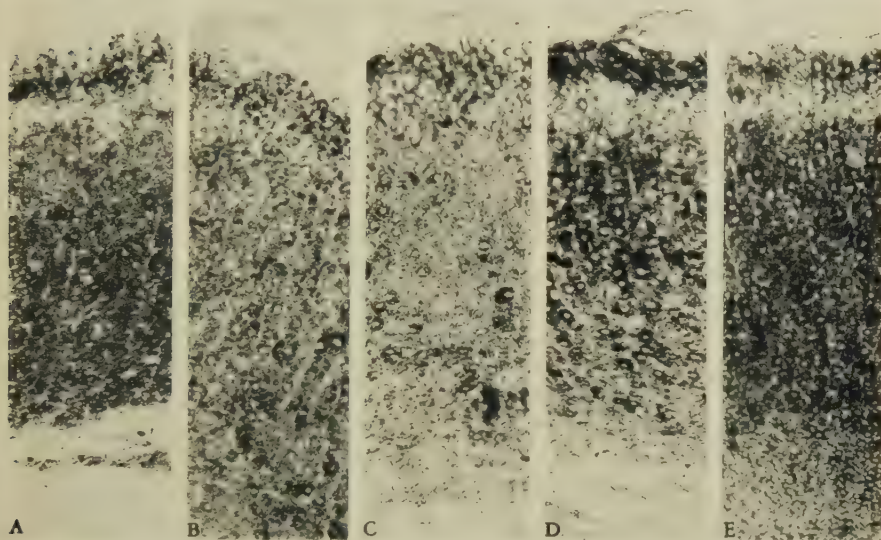


Abb. 1. Schwund der Lipoide der Nebennierenrinde. Intravenöse Injektion von 1% igem Trypanblau. Färbung nach Sudan III. A Vor der Injektion. B, C, D, E Nach Verlauf von 30 min und 2, 4 und 24 Std nach der Injektion des Farbstoffes.

zogen wurden. Wohingegen Ratten, die 420 min bis 6 Tage später nach der Farbstoffinjektion dekomprimiert wurden, in ihrem Verhalten keinerlei Differenzen zu den Kontrolltieren zeigten.

Man darf auf Grund dieser Resultate schließen, daß die Injektion von Trypanblau- und Eisensaccharatlösungen, welche durch ihre Deponierung in den Zellen des R.E.S. einen partiellen und transitorischen Block dieses organischen Systems produzieren, einen Zustand erhöhter Resistenz gegenüber der Verminderung der Sauerstoffversorgung in den Geweben hervorrufen. Der höchste Resistenzgrad in unseren Experimenten wurde 2 Std nach der Injektionsblockade des R.E.S. erhalten.

Das morphologische Studium der Nebennieren einer Gruppe von Ratten, die sowohl die gleiche Dosis Trypanblau empfangen hatten als auch innerhalb derselben Zeiträume nach der Injektion des Trypanblau

sowie der Anoxämie-Experimente getötet worden waren, gestattete uns einen graduellen Schwund der Lipoiden der Cortex suprarenalis festzustellen.

Die unmittelbar nach der Injektion von Trypanblau getöteten Tiere der 1. Gruppe zeigten keine meßbaren Variationen in ihrem Lipoidgehalt im Vergleich zu den Nebennieren der Kontrolltiere.

In der 2. Gruppe, nach Tötung im Abstand von 30 min nach der Injektion des Farbstoffes, konnte eine deutliche Abnahme der Lipoiden im Bereich der zona fascicularis festgestellt werden, hingegen keinerlei Veränderungen in der Höhe der zona glomerularis (Abb. 1 B).

Äußerst eklatant manifestierte sich der Lipoidschwund in der 3. Gruppe, also bei denjenigen Ratten, die 120 min nach der Injektion der 1% igen Trypanblaulösung getötet wurden. Man sieht sehr schön den nahezu vollständigen Schwund in der fasciculären Zone, während die glomeruläre ihren Lipoidgehalt konserviert hat (Abb. 1 C).

Die 4. und 5. Gruppe, welche 7 und 24 Std nach der Trypanblauinjektion getötet wurden, zeigen eine deutliche, progressive Regeneration der Lipoiden innerhalb der Nebennierenrinde. Diese Restitution ist so kräftig, daß die nach 24 Std getöteten Tiere keine nennenswerten Differenzen zu den Kontrollratten mehr aufweisen. Der Lipoidgehalt der Nebennieren ist in beiden Rattengruppen histologisch gleich.

Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß die Injektion von Trypanblau oder Eisensaccharat zu einer Sekretionssteigerung der adreno-corticalen Hormone führt, welche sich in der Folge an den Nebennieren durch konstante, morphologische Änderungen im Sinne der Abnahme der corticalen Lipoiden im Bereich der zona fascicularis manifestiert, während der glomeruläre Anteil von diesem Lipoidverlust nicht oder zumindest kaum betroffen wird.

Zwecks weiterer Informationen wurden die Variationen der Leukocytenzahlen und des weißen Blutbildes an einer Gruppe von trypanblauinjizierten Ratten studiert. Es ist bekannt, daß die adreno-corticale Hormonhypersekretion sich in einer Verschiebung des Blutbildes ausdrückt, die zwar nicht spezifisch, aber charakteristisch für die Stimuli ist, welche die Alarmreaktion auslösen. Sie besteht in Erhöhung der Leukocytenzahl und einer relativen Neutrophilie, Lymphopenie und Eosinopenie.

Nach Injektion von 1 ml 1% iger Trypanblaulösung in die Schwanzvenen von 8 Ratten wurden in bestimmten Zeitintervallen, die sich im Maximum bis über 24 Std erstreckten, Blutbild und -formel studiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Veränderungen in den Leukocytenzahlen und der Formel tragen den Stempel der charakteristischen Änderungen während der Alarmreaktion. Man beobachtet eine Zunahme der Leukocytenzahl im Anfangs-

stadium, auf Grund einer Neutrophilie, und gleichzeitig einen jähen Abfall der Lymphocytenziffer, begleitet von einem fast vollständigen Schwund der eosinophilen Elemente. Diese Veränderungen verschwinden nach Ablauf von 24 Std.

Tabelle 2. Weiße Blutzellen nach i.v. Injektion von 10 mg Trypanblau.
Durchschnitt von 8 Ratten.

Zeit	vorher	nach Stunden			
		2	5	8	24
Leukocyten	11500	17500	9800	7500	14000
Neutrophile	2800	9500	7400	4900	6100
Kleine Lymphocyten . . .	6000	5000	1000	1200	6400
Große Lymphocyten . . .	2300	2800	1000	1000	1100
Eosinophile	480	210	100	20	350
Neutrophile %	24	54	78	69	44
Kleine Lymphocyten % . .	52	29	11	16,5	46
Große Lymphocyten % . .	20	16	10	14	8
Eosinophile %	4	1	1	0,5	2

Diese Ergebnisse stützen den Gedanken, daß die Hypoxämie-Resistenz als spezifische Reaktion auf die Trypanblau- oder Eisensaccharat-injektion nach einer bestimmten Zeit manifest wird (in unseren Experimenten nach Ablauf von 2 Std) und auf eine adreno-corticale Hormon-Hypersekretion zurückzuführen ist, analog einer Alarmreaktion.

Es ist bekannt, daß die Injektion adreno-corticaler Hormone die Hypoxämie-Resistenz normaler und suprarenoligierter Ratten erhöht^{6, 7}. Während im Gegensatz dazu die Suprarenalektomie die Tiere gegenüber der langsamen Dekompression sensibilisiert⁸.

SELYE^{3a} konnte zeigen, daß das generalisierte, anaphylaktoide Ödem, welches durch parenterale Injektion von Hühnereiweiß bei der Ratte auftritt, durch eine ganze Reihe A.R.-auslösender Substanzen völlig unterdrückt werden kann; dabei nahm er an, daß die Alarmreaktion im Sinne der sogenannten „crossed resistance“ einen Schutzeffekt darstellt. Es wäre durchaus möglich, daß dieser Schutzeffekt von der gesteigerten Ausschüttung von Nebennierenhormonen abhängig ist, die während der A.R. gebildet werden.

Hinsichtlich des Produktionsmechanismus dieser durch Trypanblau und Eisensaccharat hervorgerufenen corticalen Hypersekretion verdient es Beachtung, daß die pars distalis der Hypophyse durch Trypanblau intensiv gefärbt wird und sich der Farbstoff auch im Infundibulum tuberalis anhäuft. Beides könnte im Sinne einer direkten Stimulierung der Hypophyse gedeutet werden.

Zusammenfassung.

Injektionen von Trypanblau bzw. Eisensaccharat, beides Substanzen, die der experimentellen Blockierung des R.E.S. dienen, bewirken bei der Ratte eine Steigerung der Hypoxämie-Resistenz. Die Injektion der

beiden Stoffe bewirkt eine Steigerung der adreno-corticalen Hormonproduktion, die sich in Form eines Lipoidschwundes im Bereich der zona fascicularis der Nebennieren bei gleichzeitiger Verschiebung des weißen Blutbildes manifestiert, also die Charakteristika der „Alarm-Reaktion“ aufweist.

Die Hypoxämie-Resistenzerhöhung, welche die Injektion dieser Substanzen bewirkt, wird als Schutzeffekt im Sinne der „crossed resistance“ nach SELYE interpretiert.

Literatur.

HOUSSAY, R. H.: Las suprarrenales en la hipoxia y la intoxicación por la histamina. B. Aires: El Ateneo 1951. — ² JAMES, G. W. III, O. J. PURNELL u. E. I. EVANS: J. Clin. Invest. **30**, 191 (1951). — ^{3a} SELYE, H.: Endokrinol. **21**, 169 (1937). — ^{3b} SELYE, H.: Stress. Acta. Montreal 1951. — ⁴ THORN, G. W., B. F. JONES, R. A. LEWIS, E. R. MITCHELL u. G. F. KOEPT: Amer. J. Physiol. **137**, 606 (1942). — ⁵ THORN, G. W., M. CLINTON jr., B. M. DAVIS u. R. A. LEWIS: Endokrinol. **36**, 381 (1945). — TIMIRAS, P. S.: Rev. Canad. de Biol. **10**, 89 (1951). — ⁷ UOTILA, U., u. A. PEKKARINEN: Endokrinol. **6**, 23 (1951).

Dr. J. L. ARTETA u. Dr. J. R. PUCHOL,
Instituto de Endocrinología Experimental, Madrid/Spanien.

Aus der Hautklinik der Philipps-Universität Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. K. W. KALKOFF).

Vergleichende Untersuchungen über die exsudations- hemmende Wirkung von Calcium und Strontium am Eiweißödem der Rattenpfote.

Von

R. BICKHARDT und H.-J. HEITE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. September 1953.)

Die Hemmung allergisch-exsudativer Reaktionen gelingt bekanntlich durch Eingriffe in den Mineralhaushalt, die eine Herabsetzung der Quellungsbereitschaft des Gewebes bewirken, z. B. Natriumentzug (kochsalzarme Diät, Obst- und Safttage o. ä.) oder durch parenterale Zufuhr von Erdalkalimetallen (Calcium-, Strontiumsalzen). Während die intravenöse Calciumtherapie seit ihrer Einführung zu Beginn unseres Jahrhunderts ihren Platz unverändert behaupten konnte, spielte das Strontium nur vorübergehend in den zwanziger Jahren eine wesentliche Rolle.

Aus diesem Zeitraum liegen zahlreiche günstige klinische Erfolgsberichte, insbesondere bei allergischen Krankheiten vor. So berichtet KEMPINSKI über günstige Erfolge beim Bronchialasthma, GRASSHEIM beim Heufieber, während JOSEF und ROSENDORF, SPINDLER, JUNG, MASSA, NEES sowie KADISCH und RITTER die gute, insbesondere juckreizstillende Strontiumwirkung bei verschiedensten allergischen Hauterkrankungen hervorheben. Offenbar hat aber die intravenöse Strontium-Therapie, ähnlich einem Modepräparat, nur vorübergehend praktische Bedeutung erlangt und geriet alsbald wieder in Vergessenheit.

Seit langem ist bekannt, was in neueren Untersuchungen von HUBER und HOFSTETTER an Hand der Blutkammerwasserschranke des menschlichen Auges bestätigt wird, daß die Wirkung einer intravenösen Calcium-Spritze kaum länger als 2 Std anhält. Dadurch wird verständlich, daß eine Calcium-Injektion klinisch nur selten eindrucksvolle Ergebnisse zeitigt. Da die Berichte aus den zwanziger Jahren aber übereinstimmend eine deutliche Überlegenheit des Strontium hinsichtlich Wirkungsdauer und Intensität betonen, schien es wünschenswert, diese eindrucksmäßig erhobenen Befunde an einem geeigneteren Testobjekt nachzuprüfen als dies an Hand des klinischen Erfolges am Krankenbett möglich ist.

Tatsächlich konnten bei quantitativ vergleichender Prüfung HEITE, HINRICHS und REMKY an der Kammerwasserschranke des Kaninchenauges eine länger anhaltende und intensivere membranabdichtende Wirkung des Strontium-gluconicum bestätigen. Die intravenöse Strontium-Therapie der zwanziger Jahre ist daher wohl nicht wegen mangelnder Wirksamkeit verlassen worden, sondern aus anderen

Gründen „außer Mode“ gekommen, wobei nicht zuletzt die Propaganda für warenzeichengeschützte Calcium-Präparate durch die pharmazeutische Industrie eine Rolle gespielt haben mag.

Als ein quantitativ faßbares tierexperimentelles Modell eines allergischen Exsudationsvorganges diene uns das Eiweißödem der Rattenpfote.

Die von SELYE mitgeteilte Beobachtung, daß Ratten — offenbar infolge artspezifisch bedingter Überempfindlichkeit — auf intraperitoneale Zufuhr von Hühnereiweiß mit Ausbildung eines allgemeinen Ödems der Akren (mit Ausnahme des Schwanzes) reagieren, wurde mit größerer Regelmäßigkeit bestätigt für das lokale Ödem bei Injektion von Eiweiß in die Pfote. Dieses eignet sich wegen der guten Reproduzierbarkeit zur pharmakologischen Prüfung von allerlei „entzündungshemmenden“ Stoffen, z. B. von Antihistaminicis (LEGER und MASSON, HALPERN, GROSS, WILHELMI und DOMENJOZ, FISCHER und FREY, KÜCHLE und WEGENER), von Sympathicomimeticis (CLARK und McKAY, GROSS) oder von Pyrazolonderivaten (WILHELMI und DOMENJOZ, GROSS, KÜCHLE und WEGENER). Auch parenterale Calcium-Gaben zeigten einen deutlich hemmenden Einfluß.

Methodik und Versuchsanlage.

Gruppen von 5—10 Ratten wurde frisches natives Hühnereiweiß 1:3 mit 0,9% iger NaCl-Lösung verdünnt in der Menge von 0,1 ml subcutan in eine Hinterpfote plantar injiziert; die andere Hinterpfote erhielt zur Kontrolle die gleiche Menge Kochsalzlösung.

Die quantitative Erfassung des sich entwickelnden entzündlichen Ödems kann entweder durch grobe Schätzung nach einem Punkte-System (WILHELMI und DOMENJOZ, HEILMEYER, FREY und FISCHER) oder durch Messung erfolgen. Hierzu benützen KÜCHLE und WEGENER ein Überlaufsystem unter Messung der durch die Pfote beim Eintauchen bis zu bestimmter Marke verdrängten Flüssigkeit; WILHELMI und DOMENJOZ verfolgen in einer späteren Arbeit die Größe des sich entwickelnden Pfotenödems mittels pletysmographischer Messung.

Wir gingen in Anlehnung an HALPERN und BRIOT und FABINYI-SZEBEHELY u. Mitarb. so vor, daß 120 min nach Eiweiß- bzw. Kochsalzinjektion die beiden Hinterpfoten im Sprunggelenk seitengleich exartikuliert und gewogen wurden. Die Gewichts-differenz zwischen beiden Hinterpfoten gibt dann, abgesehen von Streuungsfaktoren infolge asymmetrischer Anlage der Hinterpfoten oder ungleichmäßiger Amputation, unmittelbar die Größe der entzündlich-allergischen Exsudation an.

Um die hierbei auftretenden und das Ergebnis fälschenden Streuungsfaktoren größenordnungsmäßig abzuschätzen, wurden im Vorversuch bei 10 unbehandelten Ratten beide Unterschenkel nach Tötung der Tiere durch Chloroform-Inhalation amputiert und gewogen. Die dabei auftretenden „zufälligen“ Gewichts-differenzen sind in Tab. 1 den „systematischen“ Gewichtsunterschieden zwischen Eiweiß und Kochsalz-Injektion gegenübergestellt. Dabei ergibt sich eine durchschnittliche Differenz von 5,7 mg bei unbehandelten und 517 mg bei den präparierten Rattenpfoten. Die durchschnittliche Größe der Störfaktoren beträgt also etwa 1%, ein recht befriedigendes Ergebnis. Die Gewichtsschwankungen der unbehandelten Rattenpfoten bei den einzelnen Individuen können hierbei außer Betracht bleiben, da lediglich die Gewichts-differenzen zwischen rechter und linker Hinterpfote beim gleichen Tier zur Bewertung herangezogen wurden.

Die Einfachheit und hohe Genauigkeit dieser quantitativen Auswertung wird erkauft durch den Verzicht auf die Beobachtung des zeitlichen Ablaufes bei

Entstehung und Rückbildung des Ödems. Die Untersuchungen von GROSS, HEILMEYER, FREY und FISCHER, KLEIN, NEUMANN und STRACKE, WILHELMI und DOMENJOZ sowie KÜCHLE und WEGENER zeigen jedoch, daß der Höhepunkt der entzündlich ödematösen Schwellung unabhängig von Art und Größe seiner pharmakologischen Beeinflussung stets zwischen 90 und 150 min ausgeprägt ist. Zur quantitativen Beurteilung genügt daher eine einmalige Messung der Ödemgröße, gewissermaßen eine „Momentaufnahme“. Deshalb wurde in allen Versuchen Tötung und Pfotenamputation stets 120 min nach Eiweiß- bzw. Kochsalzinjektionen vorgenommen.

Tabelle 1. Größenordnungsmäßiger Vergleich „zufälliger“ und „systematischer“ Gewichts differenzen zwischen rechter und linker Rattenhinterpfote bei Exartikulation im Sprunggelenk. Die präparierten Rattenpfoten erhielten 2 Std vor Exartikulation 0,1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung bzw. 0,1 ml 1:3 verdünntes natives Hühnereiweiß.

Tier- gewicht in g	Gewicht unbehandelter Hinterpfoten in mg		Differenz in mg	Tier- gewicht in g	Gewicht präparierter Hinterpfoten in mg		Differenz in mg
	rechts	links			rechts (Eiweiß)	links (NaCl)	
126	1096	1084	12	110	1198	821	377
134	1149	1142	7	122	1438	886	612
112	1046	1017	19	105	1308	925	383
116	998	1008	— 10	130	1400	960	440
108	997	995	2	130	1641	968	673
113	1009	1000	9	115	1575	995	580
113	1081	1084	— 3	115	1361	940	421
102	977	960	17	132	1698	1113	585
115	1079	1066	13	122	1487	925	562
124	1081	1102	— 19	125	1480	943	537
Mittelwert: 5,7 mg				Mittelwert: 517 mg			

Es bleibt zu berücksichtigen, daß das Ausmaß der allergisch-entzündlichen Pfotenschwellung erheblichen Schwankungen unterliegen kann in Abhängigkeit sowohl von der Eigenschaft des Eiweiß-Allergens als auch von der Reaktionsweise der Rattenrasse. Vergleichbar sind daher, wie Tab. 2 zum Ausdruck bringt, die Ödemgrößen nur innerhalb einer Versuchsserie, die jeweils mit dem gleichen Allergen bei Ratten der gleichen Herkunft angesetzt wurde.

Die Applikation der beiden Erdalkalimetalle erfolgte in Lösungen äquimolarer Konzentration und geometrisch (um den Faktor $1/\sqrt{10} = 0,316$) abgestufter Menge $\frac{1}{4}$ Std vor Eiweißinjektion durch intraperitoneale Injektion. Benutzt wurde eine 5%ige Lösung von Calcium-gluconicum bzw. die ihr äquimolare von 5,5% Strontium-gluconicum; die injizierten Lösungsmengen betrugen dann je 100 g Ratte 1,5 ml; 0,47 ml oder 0,15 ml. Gebraucht wurden insgesamt 225 Ratten.

Ergebnisse.

Zunächst sei in Tab. 2 die Größe des unter der Vorbehandlung mit hohen Dosen 1,5 ml/100 g Ratte Calcium bzw. Strontium-gluconicum entstandenen Ödems gegenübergestellt. Dabei zeigt das Strontium eine Ödemmindering nahezu auf die Hälfte, während nach Calcium nur eine Verringerung auf etwa 80% erreichbar ist.

Die Änderung der mittleren Ödemgröße liegt größenordnungsmäßig beim Calcium etwa in Höhe der dreifachen, beim Strontium der siebenfachen Streuung, also in einem Bereich, der durch Zufall nicht befriedigend erklärt werden kann.

Tabelle 2. Größe des bei 30 Ratten unter Calcium- bzw. Strontium-Vorbehandlung (mit 1,5 ml Lösung je 100 g) entstehenden Eiweißödems der Pfoten in mg.

	Versuchsserie 1			Versuchsserie 2		
	Kontrolle	Calcium	Strontium	Kontrolle	Calcium	Strontium
Einzelmeßwerte	643	539	327	485	549	274
	788	650	389	504	332	217
	846	516	382	576	349	348
	772	679	553	421	413	275
	749	597	372	524	453	155
Mittelwert . . .	759,6	596,2	404,6	502,0	419,2	253,8
Streuung des Mittelwertes .	± 29,7	± 27,9	± 34,5	± 22,7	± 34,9	± 28,9
Ödemgewicht in Prozent . .	100	77,5	52,4	100	83,6	50,5

Weiterhin wurde unter stufenweiser Verminderung der Calcium- bzw. Strontiumsdosis die eben noch wirksame Grenzdosis ermittelt.

Tab. 3 zeigt ein Erhaltenbleiben des Strontiums-Effektes bei Verminderung der Dosis auf rund $\frac{1}{3}$; die Calcium-Wirkung ist bei dieser verminderten Dosis bereits nicht mehr nachweisbar. Die Strontium-

Tabelle 3. Größe der Hemmung des Eiweißödems der Rattenpfoten in Abhängigkeit von der Ca- bzw. Sr-Dosis.

Dosis in ml pro 100 g Tier bei intraperitonealer Applikation 15 min vor Eiweißinjektion ml	Calcium 5% ige Lösung				Strontium 5,5% ige Lösung			
	Zahl der Tiere	Mittlere Ödemgröße in mg			Zahl der Tiere	Mittlere Ödemgröße in mg		
		be-handelt	unbe-handelt	in % der Kontrollen		be-handelt	unbe-handelt	in % der Kontrollen
1,5	5	419	502	= 83,4	5	254	502	= 50,7
1,5	5	596	759	= 77,3	5	405	759	= 53,4
0,47	10	534	517	= 103	10	375	517	= 72,5
0,47	10	649	648	= 100	5	550	759	= 72,5
0,15	10	613	544	= 113	10	561	544	= 103
0,15					10	643	648	= 99

Wirkung dagegen verschwindet erst, wenn die Dosis auf $\frac{1}{10}$ reduziert wird. Es erweist sich daher das Strontium nicht nur in hohen Dosen wirksamer als das Calcium; es zeigt auch eine etwa um den Faktor 3 niedriger liegende wirksame Grenzdosis.

Ferner wurde der Frage nachgegangen, ob die an der Blutkammerwasserschranke des Kaninchens gefundene, wesentlich längere Wirkungs-
dauer des Strontiums gegenüber dem Calcium sich auch am Rattenpfoten-
ödem nachweisen läßt.

Hierzu wurde die Erdalkalimetallvorbehandlung in der hohen Dosis von 1,5 ml/100 g Ratte 1—8 Std vor der Eiweißinjektion vorgenommen. Die unter dieser zeitlich variierten Vorbehandlung gemessenen mittleren Ödemgrößen bei Gruppen von je 8 Ratten sind in die graphische Darstellung der Abb. 1 als Meßpunkte eingetragen. Gegenüber den als

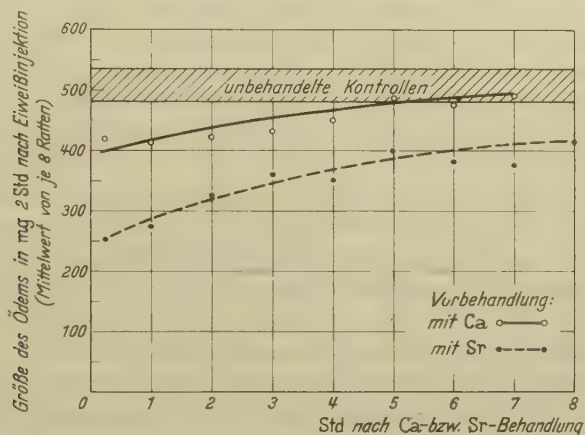


Abb. 1. Größe des Eiweißödems der Rattenpfote nach verschieden lange zurückliegender Vorbehandlung mit Calcium- bzw. Strontium-gluconicum (1,5 cm³/100 g i. p. der 5% bzw. 5,5% igen Lösung) gegenüber unbehandelten Kontrolltieren (Mittelwerte von je 8 Ratten).

schräffiertes Band eingezeichneten Kontrollwerten, die an den gleichen Tagen und bei der gleichen Rattenrasse wie die Meßwerte gewonnen wurden, ergibt sich ein Absinken der Calciumwirkung auf unwirksame Werte bereits nach etwa 5 Std. Dies entspricht den Befunden von HUBER und HOFSTETTER an der Blutkammerwasserschranke des Menschen sowie denen von HEITE, HINRICHS und REMKY am Kaninchen. Demgegenüber sind äquimolekulare Mengen von Strontium nicht nur wirksamer, sondern auch wesentlich länger anhaltend; noch nach 6, 7 und 8 Std ist eine erhebliche Ödemminderung nachweisbar, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Calciumwirkung bereits abgeklungen ist.

Diskussion und Schlußfolgerung.

Die pharmakologische Ähnlichkeit von Calcium und Strontium, die hinsichtlich ihrer membranabdichtenden bzw. exsudationshemmenden Wirkung bisher nur an der Blutkammerwasserschranke des Kaninchens nachgewiesen war, konnte an einem weiteren tierexperimentellen Modell,

dem Rattenpfotenödem, demonstriert werden. Dabei ergab sich übereinstimmend zur Blutkammerwasserschranke eine im Ausmaß überlegene und wesentlich länger (7—8 Std) anhaltende Wirksamkeit des Strontiums. Wir möchten in diesen Befunden eine weitere tierexperimentelle Stütze für die eingangs erwähnten klinischen Erfolgsberichte über die intravenöse Strontiumtherapie bei entzündlich-exsudativen Erkrankungen sehen.

Zusammenfassung.

1. Bei 210 Ratten wurde die Minderung des durch Injektion von nativem Hühnereiweiß erzeugten Pfotenödems durch Vorbehandlung mit Calcium- und Strontium-gluconicum quantitativ vergleichend untersucht.

2. 1,5 ml der 5%igen Calcium- bzw. der äquimolekularen 5,5%igen Strontiumlösung, intraperitoneal injiziert, bewirken eine 20- bzw. 50%ige Ödemmindernng.

3. Bei Verringerung der Calciumdosis auf ein Drittel ist keine ödem-mindernde Wirkung mehr nachweisbar; die Strontiumwirkung verschwindet erst bei Dosis-Verringerung auf ein Zehntel.

4. Die Calciumwirkung klingt schnell ab und ist nach 5 Std nicht mehr nachweisbar; Strontium dagegen entfaltet noch 8 Std nach der Injektion eine deutliche ödem-mindernde Wirkung.

5. Am Rattenpfotenödem erweist sich daher das Strontium gegenüber äquimolekularen Dosen Calcium hinsichtlich Wirkungsstärke und -größe überlegen.

Literatur.

- CLARK, W. G., and E. M. MAC KAY: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **71**, 84 (1949). — FABINYI-SZEBEHELY, M., L. HAHN and J. SZEBEHELY: *Brit. J. Pharmacol.* **8**, 30 (1953). — FISCHER, R., u. J. FREY: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 392 (1951). — GRASSMANN, K.: *Klin. Wschr.* **1925**, 39. — GROSS, F.: *Schweiz. med. Wschr.* **1950**, 697. — HALPERN, B. N.: *Presse méd.* **57**, 949 (1949). — C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 825 (1949). — HALPERN, B. N., u. BRIOT: *Zit. nach HEILMEYER u. Mitarb.*: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 387 (1951). — HEILMEYER, L., J. FREY u. R. FISCHER: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **213**, 387 (1951). — HEITE, H. J., K. HINRICHS u. H. REMKY: *Klin. Wschr.* **1953**, 333. — HOFSTETTER, M.: *Schweiz. med. Wschr.* **1948**, Nr. 19. — HUBER, A.: *Ophthalmologica* (Basel) **116**, 235 (1948). — JOSEF, W., u. ROSENDORF: *Dtsch. med. Wschr.* **1928**, 145. — JUNG, F.: *Klin. Wschr.* **1927**, 1860. — KADISCH, E., u. H. RITTER: *Ther. Gegenw.* **1927**, 46. — KEMPINSKI, A.: *Dtsch. med. Wschr.* **1925**, 1561. — KLEIN, H.: *Klin. Wschr.* **1951**, 548. — KÜCHLE, H. J., u. H. WEGENER: *Z. exper. Med.* **118**, 136 (1952). — LÉGER, J., and G. MASSON: *Amer. J. Med. Sci.* **214**, 305 (1947). — MASSA, E.: *Clinical* (Buenos Aires) **2**, 17 (1927). — NEES, F.: *Münch. med. Wschr.* **1927**, 1569. — SELYE, H.: *Endocrinology* **21**, 169 (1937). — SPINDLER, H. v.: *Dtsch. med. Wschr.* **1927**, 147. — WILHELMI, G., u. R. DOMENJOZ: (1) *Arch. internat. Pharmacodynamie* **85**, 129 (1951). — (2) *Arzneimittel-Forsch.* **1**, 151 (1951).

Priv.-Doz. Dr. HANS-J. HEITE, Marburg/Lahn, Universitäts-Hautklinik.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Akademie für medizinische Forschung und Fortbildung Gießen (Direktor: Prof. Dr. F. HILDEBRANDT).

Die Wirkung der starken Analgetica Polamidon, Polamidon C (Polamivet) und Dromoran auf die Darmmotilität.

Von

F. HILDEBRANDT und E. MATTHÄY.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Oktober 1953.)

In seinen „Studien über Darmmotilität“ hat W. STRAUB in seiner bekannten klassischen und präzisen Form die Gesetzmäßigkeiten zwischen Füllungsdruck, Volumenzunahme und Peristaltik am Meerschweinchendarm in situ und ihre Beeinflussung durch Alkaloide der Atropin- und Morphingruppe festgelegt und dabei festgestellt, daß die Wirkung des Morphins in einer Herabsetzung des Tonus besteht und daß die Lähmung der Peristaltik nur eine scheinbare ist, „denn wenn die durch den Tonusverlust verminderte Spannung durch Füllungszuwachs kompensiert wird, tritt stets wieder die alte Peristaltik auf“.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die neuen starken Analgetica Polamidon, Polamidon C (Polamivet) und Dromoran* bezüglich ihrer Wirkung auf die Motilität des Meerschweinchendünndarms in Gestalt seiner Dehnungskurven in situ geprüft. Wir hielten uns dabei streng an die von W. STRAUB ausgearbeitete Methodik.

1. Polamidon.

Das von EHRHART u. SCHAUMANN eingeführte Polamidon [2-Dimethylamino-4,4'-diphenyl-heptanon(5)hydrochlorid] ist in bezug auf seine Darmwirkung bereits von einigen Autoren untersucht. Einer Notiz der Chemiker BOCKMÜHL u. EHRHART ist zu entnehmen, daß SCHAUMANN das Verhältnis zwischen zentraler analgetischer Wirkung und peripherer Spasmolyse untersucht hat. Ein Vergleich mit Dolantin = 1 ergab dabei einen 5—10mal stärkeren zentral analgetischen Effekt, während die Spasmolyse gegenüber Lentin, BaCl₂ und Histamin im Vergleich zu Dolantin 1/2 bzw. 1 bzw. 1/5 der Dolantinwirkung betrug. Am isolierten Darm (LINDERER, BAUMHOFF u. SCHÜRMEYER, HOFFMANN u. KEMPE, BERGE u. MÜLLER) wirkt es spasmolytisch, während es am Hund in situ nach KNOBLAUCH u. KRAUSE zunächst vorübergehend die Dünndarmmotilität steigert mit späterem Stillstand bei hohem Tonus, was nach SCOTT u. Mitarb. auf einer zentralen Steigerung der Reflexerregbarkeit des Vaguszentrums neben einer peripheren Minderung der Empfindlichkeit des die Darmbewegungen steuernden Auerbachschen Plexus beruht.

* Versuchsmengen von Polamidon und Polamivet wurden uns in dankenswerter Weise von den Farbwerken Hoechst, Dromoran von Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

KEWITZ, REMMER u. ENGELHARDT fanden am — nicht narkotisierten — Menschen mit Dünndarmfistel durch 7,5 mg Polamidon i.v. (im Gegensatz zu 10 mg Morphinsalz) *keinen* Effekt auf die Peristaltik.

Dosen von 0,02—0,1 mg/kg haben keinerlei Einfluß weder auf den Tonus noch auf die Höhe des die Peristaltik auslösenden Dehnungsreizes. Erst bei 0,25 mg zeigt sich der erste Unterschied gegenüber der Norm (siehe Abb. 1a u. b).

Bei dieser Schwellendosis muß der Füllungsdruck gegenüber dem Wert vor der Injektion um 0,9 cm erhöht werden bei einer Zunahme des Füllungsvolumens um 0,15 cm³. Bei Dosen von 0,5—2 mg s.c. ist die

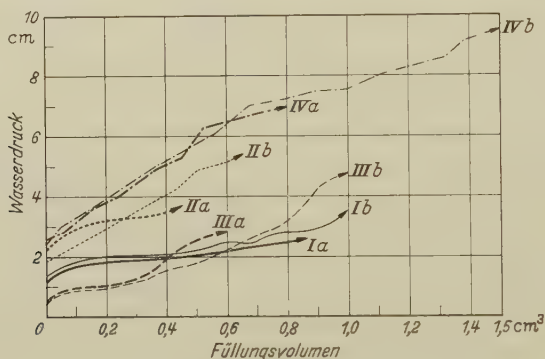


Abb. 1. Polamidon.

vor Injektion	nach Injektion	
Ia ———	Ib ———	0,25 mg/kg Meerschweinchen
IIa	IIb	0,5 mg/kg
IIIa - - - -	IIIb - - - -	1,0 mg/kg
IVa - - - -	IVb - - - -	2,0 mg/kg

Erläuterungen im Text.

Die Kurven bedeuten jeweils die Mittelwerte aus einer ganzen Reihe von Versuchen; die Pfeilspitzen bezeichnen das Auftreten der Peristaltik.

Hemmung der Peristaltik in Parallele zur Dosierung stärker, doch nimmt das Füllungsvolumen im Vergleich zur Steigerung des für die Auslösung der Peristaltik nötigen Füllungsdruckes etwas stärker zu (Abb. 1). Während aber nach W. STRAUB unter Morphin die Füllungsdrucke für die Auslösung des peristaltischen Reflexes eine 5fache Volumenzunahme des Dünndarms bewirken, ist die Volumenzunahme unter Polamidon nicht entfernt so stark im Vergleich zu der unter Morphin. Bei der von uns höchstangewandten Dosis von 4 mg/kg ist die Peristaltik völlig gelähmt: auch eine Drucksteigerung von 4 auf 21 cm löst noch keine Peristaltik aus.

Das Polamidon unterscheidet sich demnach deutlich vom Morphin insofern, als es den Tonus des Darmes nicht so stark herabsetzt wie das Morphin und andererseits die Peristaltik bei hoher Dosierung zum Ver-

schwinden bringt, während bei Morphin nach STRAUB sogar der 500fache Wert der Schwellendosis immer noch die Peristaltik bei entsprechend hohem Füllungsdruck auftreten läßt.

2. Polamidon C (Polamivet).

Zur Ausschaltung des akuten parasymphaticomimetischen Effektes wurde dem Polamidon ein zweiter atropinartig wirkender Körper (Diphenylpiperidinoäthylacetamid) zugesetzt. Dieses Präparat hat sich unter dem Namen Polamidon C oder Polamivet vornehmlich in der Veterinärmedizin sehr gut bewährt.

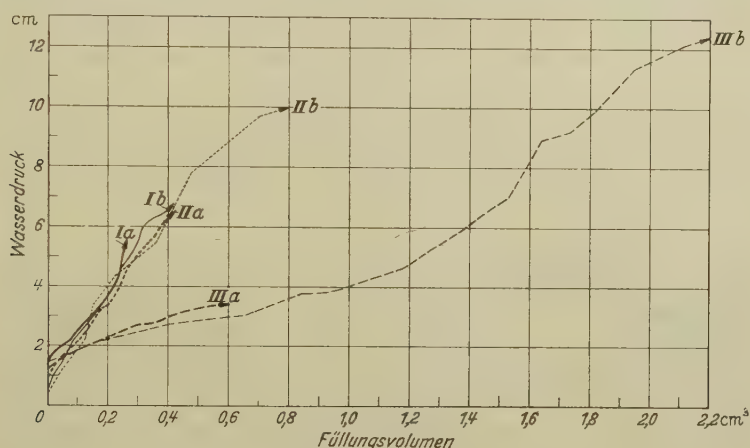


Abb. 2. Polamidon C (Polamivet.)

vor Injektion	nach Injektion	
Ia ———	Ib ———	0,2 mg/kg Meerschweinchen
IIa - - - -	IIb - - - -	2,0 mg/kg
IIIa - - - -	IIIb - - - -	4,0 mg/kg

Die Grenzdosis liegt bei 0,2 mg/kg für die Hemmung des Peristaltikreflexes. Dabei tritt eine deutliche Senkung des Tonus auf. Bei den höheren Dosen — untersucht wurden 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 4 mg und 5 mg — steht die Erhöhung des Füllungsdruckes (vermehrte Hemmung) hinter der Zunahme des Füllungsvolumens sehr zurück (Abb. 2).

Durch den Zusatz des atropinähnlichen Körpers wird die tonussenkende Wirkung demnach etwas gefördert, doch verläuft die Dehnungskurve nicht entfernt so flach wie unter Morphin.

3. Dromoran „Roche“.

Das von SCHNIDER u. GRÜSSNER entwickelte „Dromoran“ (Tartrat des linksdrehenden 3-Oxy-N-methylmorphinan) steht dem Morphin in seiner chemischen Konstitution sehr nahe. Nach GRUBER jr., LEE u. GRUBER sind beim Hund die peristaltischen Bewegungen und die rhythmischen Darmkontraktionen bei kleineren Dosen vermehrt, bei höheren erniedrigt.

Die analgetische Wirkung am Menschen ist nach klinischen Erfahrungen (v. RECHENBERG u. ZEERLEDER) 3—5 mal stärker als die des Morphins. Um zu prüfen, ob auch am Darm das gleiche Verhältnis vorläge, haben wir die Wirkung des Dromorans mit der des Morphins verglichen. Wir konnten dabei die von W. STRAUB für Morphin festgestellte Schwellendosis von 0,1 mg/kg bestätigen und dabei ebenso wie W. STRAUB feststellen, daß die Füllungsdrucke zur Auslösung des peristaltischen Reflexes sich unter Morphin nur wenig ändern, daß aber dabei eine beträchtliche Volumenzunahme stattfindet. Auch in unseren Versuchen war bei höchsten Dosen von Morphin keine völlige Lähmung der Peristaltik zu erreichen.

Bei Dromoran liegt die Schwellendosis bei 0,2 mg/kg s.c. Die Reizschwelle steigt um 1,3 cm Wasser, dabei beträgt die Volumenzunahme

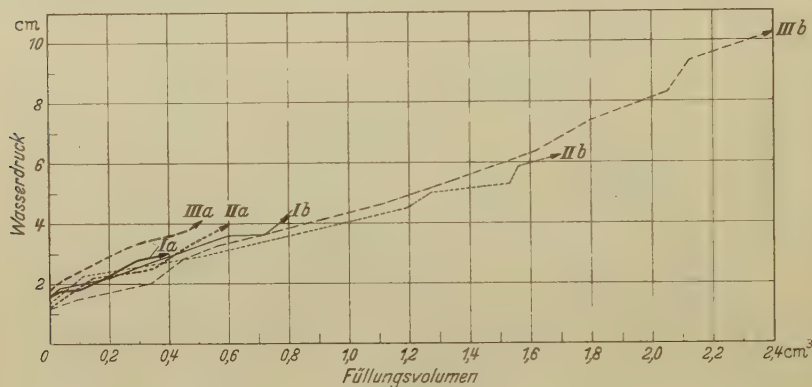


Abb. 3. Dromoran „Roche“.

vor Injektion		nach Injektion	
Ia	——	Ib	—— 0,2 mg/kg Meerschweinchen
IIa		IIb	 0,5 mg/kg ..
IIIa	——	IIIb	—— 4,0 mg/kg ..

bereits das Doppelte. Über die weiter untersuchten höheren Dosierungen siehe Abb. 3.

Nach den Befunden ist die tonussenkende Wirkung des Dromorans lange nicht so ausgesprochen wie die des Morphins.

Besprechung der Ergebnisse und Zusammenfassung.

Wenn auch aus den hier mitgeteilten Versuchen am Meerschweinchen kein direkter Analogieschluß auf den Menschen gezogen werden kann, so kann man doch einen Anhaltspunkt aus ihnen dafür gewinnen, ob bei Umrechnung der in diesen Versuchen angewandten Dosierungen pro Kilogramm Meerschweinchen auf Kilogramm Mensch der Größenordnung nach eine Wirkung auf die Darmmotilität zu erwarten ist.

Bei Polamidon liegt die Schwellendosis bei 0,25 mg/kg, das würde, auf einen Menschen von 60 kg bezogen, 15 mg bedeuten. Dies entspricht der üblichen Polamidondosierung von 5—10 mg. Da bei Polamidon C

die tonussenkende Wirkung durch den Zusatz des atropinartigen Körpers stärker ausgeprägt ist, ist bei den therapeutisch gewöhnlich angewandten Dosen von 5,25—10,5 mg (5,0 Polamidon + 0,25 Diphenylpiperidinoäthyl acetamid-HCl) mit einer ausgesprochenen Hemmung der Darmmotilität zu rechnen.

Für Morphin hat bereits STRAUB (4) festgestellt, daß die am Meerschweinchen wirksame Morphindosis der ungefähren Größenordnung der menschlichen Therapie entspricht (0,1 mg/kg Meerschweinchen = 6 mg/60 kg Mensch). Nach klinischen Erfahrungen ist nun das Dromoran, wie eingangs erwähnt, in bezug auf seinen analgetischen Effekt 3—5mal wirksamer als Morphin. Die handelsüblichen Packungen enthalten 1,5 oder 2 mg. Die Schwellendosis liegt in unseren Versuchen bei 0,2 mg/kg, was einer Dosierung von 12 mg beim Menschen entsprechen würde. Es ist daher bei diesem Analgeticum bei der üblichen Dosierung nicht mit einer Wirkung auf die Darmmotilität zu rechnen.

Literatur.

- BAUMHOFF, G., u. A. SCHÜRMEYER: Med. Klin. **1950**, 489. — BERGE, E., u. H. MÜLLER: Tierärztl. Umschau **1949**, 372. — BOCKMÜHL, M., u. G. EHRHART: Liebig's Ann. **561**, 52 (1949), speziell S. 79 unter der Nummer 10820. — EHRHART, G., u. O. SCHAUMANN: Med. Mschr. **1949**, 605. — GRUBER, CH. M. jr., KWANG SCO LEE u. CH. M. GRUBER: J. of Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 317 (1950). — HOFFMANN, G., u. D. KEMPE: Klin. Wschr. **1951**, 349. — KEWITZ, H., H. REMMER u. H. ENGELHARDT: Klin. Wschr. **1951**, 570. — KNOBLAUCH, G., u. D. KRAUSE: Tierärztl. Umschau **1950**, 134. — LINDNER, E.: Süddtsch. Apoth. Ztg. **1949**, 449. — v. RECHENBERG, H. K., u. R. ZEERLEDER: Schweiz. med. Wschr. **1951**, 1086. — SCHNIDER u. GRÜSSNER: zit. n. HAGEMEYER, Med. Welt **1951**, 1286. — SCOTT, C. C., K. G. KOHLSTAEDT, K. K. CHEN, E. B. ROBBINS and F. W. ISRAEL: J. of Pharmacol. a. Exper. Ther. **91**, 147 (1947). — (1) STRAUB, W., u. P. VIAUD: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 1 (1933). — (2) STRAUB, W., u. E. LEO: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **169**, 18 (1933). — (3) STRAUB, W., u. E. FERNANDEZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **170**, 26 (1933). — (4) STRAUB, W., u. M. OZAKI: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **173**, 374 (1933).

Prof. Dr. F. HILDEBRANDT,

Direktor d. Pharmakolog. Instituts d. Med. Akademie d. Justus Liebig-Hochschule
Gießen, z. Zt. Bad Nauheim, Kerckhoff-Institut.

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. EICHHOLTZ).

Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und von anderen Phosphorverbindungen bei der Coffein- Kontraktur des Frosch- und Kröten-Rectus.

Von

A. FLECKENSTEIN, J. JANKE und M. ELKE*.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. November 1953.)

In früheren Untersuchungen ist gefunden worden, daß isolierte Froschmuskeln bei der Coffeinkontraktur (ebenso wie bei der Verkürzung durch Chloroform, Milchsäure, Natronlauge, Chinin, Rhodannatrium, Acetylcholin, Nicotin, Veratrin usw.) K^+ -Ionen an den extracellulären Raum abgeben; dabei sinkt das Membranpotential der Fasern ab. Diese K^+ -Austritte und der Potentialschwund sind aufs engste mit dem Verkürzungsakt verknüpft (vgl. FLECKENSTEIN u. Mitarb., 1—5; HARDT u. FLECKENSTEIN).

a) Die Schwelle für die Kontraktur ist mit der Schwelle für die K^+ -Abgabe und die Membran-Depolarisation identisch.

b) Mit zunehmender Verkürzung steigt regelmäßig auch die K^+ -Freisetzung an. Die Kontraktur geht dabei dem Ausmaß der Depolarisation parallel.

c) Lokalanaesthetica können die K^+ -Freisetzung und die Depolarisation des Muskels verhindern; dementsprechend wirken Lokalanaesthetica gegenüber vielen Kontrakturstoffen antagonistisch. Die Lokalanaesthetica sind dabei in gleichem Umfang kontraktur-verhütend oder kontraktur-beseitigend, wie sie die depolarisierenden Effekte der Kontrakturstoffe unterdrücken können.

d) Auch die anodische Polarisation mit Gleichstrom wirkt der K^+ -Freisetzung und der Depolarisation entgegen. Die Anode ist daher im Stande, den Kontraktur-Effekt zahlreicher Kontrakturstoffe selbst in stark konzentrierter Lösung aufzuheben.

Mit Hilfe der Anode lassen sich die pharmakologischen Kontrakturen in 2 Klassen (anodenempfindliche und anodenresistente Formen) unterteilen (4, 5): Nur die schonend depolarisierenden Stoffe (Acetylcholin und Verwandte, Nicotin, Coniin, Veratrin, Succinylbischolin, Decamethonium, KCl, RbCl und viele andere) lassen sich durch den Anelektro-

* Eine kurze Mitteilung ist schon im Rahmen der Publikation von FLECKENSTEIN und JANKE, sowie während des Physiologen-Kongresses in Homburg/Saar am 28. 9. 53 erfolgt.

tonus neutralisieren. Dagegen sind die durch Coffein, Chinin, Tribrom-äthylalkohol, Salzsäure usw. hervorgerufenen Verkürzungen („Schädigungskontrakturen“) durch die Anode nicht zu hemmen; hier scheint die Depolarisation meist unter grober Destruktion der Membranen (und eventuell der ganzen Faser) sowie unter Verlust der Repolarisierbarkeit einzutreten.

Neben diesen experimentell gut begründeten Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus von Kontrakturstoffen stehen heute noch andere Erklärungsversuche zur Diskussion: Nach der Ansicht von SZENT-GYÖRGYI, ERDÖS sowie BENDALL ist die Ursache der irreversiblen Kontrakturen in einem irreversiblen ATP-Schwund zu suchen. ATP ist nach diesen Vorstellungen an Aktomyosin adsorbiert und übt dabei auf die Hydratation des Gels stabilisierende Effekte aus. Jeder ATP-Zerfall müßte dann zu Entquellung, Präzipitation und Verminderung der Plastizität, d. h. zur Starre-Verkürzung des contractilen Proteins führen. Für die Chloroform- und Coffein-Kontraktur ist daher kürzlich von BENDALL postuliert worden: „In such cases it should be possible to demonstrate a very low ATP level.“ Die folgenden Untersuchungen sollten die Berechtigung dieser Vorstellungen zunächst bei der Coffein-Kontraktur prüfen; hierbei wurden ATP sowie sein Zerfallsprodukt ADP auf papierchromatographischem Wege getrennt und dann separat bestimmt. Dies war mit dem bisher verwendeten LOHMANNschen Hydrolyseverfahren (1) nicht möglich.

Experimenteller Teil.

Methodik.

a) *Versuchsanordnung bei der Coffein-Kontraktur.* Bei allen Experimenten kamen paarige, isolierte *M. recti* von Temporarien und Kröten (in Gefangenschaft überwinterte Frühjahrstiere) zur Verwendung. Am oberen Ende der Muskeln verblieb jeweils ein kleines Stück Sternum, an das untere, sehnige Ende wurde eine kleine Fadenschlinge gelegt. Nach Wägung und 10–15 min Aufenthalt in Frosch-RINGER-Lösung wurden die Muskeln dann an einem isotonischen Hebel befestigt (Belastung 8,5 g, Vergrößerung 3.9) und für weitere 5 min in Sauerstoff-durchperlter RINGER-Lösung belassen. Zur Befestigung am oberen Ende diente ein durch das Sternum gestochener Haken, unten die vorher angelegte Fadenschlinge. Der eine *M. rectus* wurde dann durch 2½ min dauerndes Eintauchen in eine ½%ige Coffein-RINGER-Lösung zu einer annähernd maximalen Kontraktur gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kontraktur-Muskeln — ebenso wie die nicht kontrahierten paarigen RINGER-Kontrollmuskeln — aus den Lösungen genommen, durch Scherenschlag von ihrer unteren Befestigung und vom Sternalrest abgetrennt und in einem kleinen Mörser 3 mal reichlich mit flüssiger Luft übergossen. Fadenbefestigung und Sternalrest wurden dann zurückgewogen. Die eine Versuchsreihe wurde bei einer Temperatur von 0° C, eine zweite Versuchsreihe bei 20° C durchgeführt; dementsprechend waren alle Lösungen, die mit den Muskeln nach der Präparation in Berührung kamen, jeweils auf 0° C oder 20° C temperiert.

Die Kontroll-Recti in RINGER-Lösung von 0° C zeigten beim Eintauchen in flüssige Luft meist keinerlei Längenänderungen; sie können also mit vollem Recht

als Kontroll-Recti im Ruhezustand angesprochen werden. Dagegen verkürzten sich die auf 20° C temperierten Kontroll-Recti beim Einfrieren fast regelmäßig um einen gewissen Betrag (etwa 20% der Coffein-Kontraktur). Diese Kälteverkürzung ist nach eigenen Beobachtungen durch Novocain-Vorbehandlung zu unterdrücken und scheint daher Ausdruck einer echten Erregung zu sein. Die Kontroll-Recti der 20°-Serie können also streng genommen nicht als Muskeln in voller Ruhe gelten.

b) *Papierchromatographische Arbeitsweise.* Die verwendete papierchromatographische Methode ist vor kurzem von FLECKENSTEIN und GERLACH⁶ bzw. FLECKENSTEIN und JANKE⁷ genau beschrieben worden; sie basiert auf dem — im KREBSschen Institut ausgearbeiteten — Verfahren von EGGLESTON und HEMS und gestattet in etwas modifizierter Form eine saubere Trennung und Mikrobestimmung von ATP, ADP und anderen P-Estern des Muskelgewebes. Die prinzipiellen Arbeitsgänge sind folgende:

1. Pulverisierung des in flüssiger Luft gefrorenen M. rectus und 3 min Extraktion mit 2 ml 5%iger Trichloressigsäure von 0° C. Abtrennung der Muskelbestandteile durch Zentrifugieren und Aufbewahrung der überstehenden „Muskelextrakte“ in gefrorenem Zustand bei — 18° C in der Tiefkühltruhe.

2. Auftropfen von 20 × 5 mm³ eisgekühltem Muskelextrakt auf besonders gewaschenes WHATMAN Nr-1-Papier mit „Aglä“-Mikrometerspritzen, am besten sofort nach der Extrakt-Herstellung. Rasche Trocknung jedes Tropfens im kalten Luftstrom von 3 Föhnen.

3. Anwendung des I. Lösungsmittels (90 Teile Isopropyläther + 60 Teile 85 bis 90%ige Ameisensäure) 4—5 Std lang bei 18° C in aufsteigender Anordnung; hierdurch wird der anorganische P und Kreatin-P von ATP, ADP und den phosphorylierten Zuckern abgetrennt.

4. Anwendung des II. Lösungsmittels (n-Propylalkohol + 25%iger Ammoniak + Wasser im Verhältnis 6:3:1 mit Zusatz von äthylendiamintetraessigsaurem Natrium) 24 Std lang bei 25° C in absteigender Anordnung; hierdurch wird ATP von ADP getrennt.

5. Lokalisation von ATP und ADP im Photoprint-Verfahren nach MARKHAM und SMITH mit UV-Licht der Wellenlänge 260 mμ. Bei nicht ganz vollständiger Trennung von ATP und ADP werden die kühl getrockneten Chromatogramme nochmals 20 Std lang mit dem II. Lösungsmittel behandelt.

6. Entwicklung der P-haltigen Bezirke im Chromatogramm mittels Molybdat-Reagens (25 ml 4%ige wäßrige Ammoniummolybdat-Lösung + 5 ml 60%ige Perchlorsäure + 10 ml n-HCl + H₂O ad 100,0). Die Chromatogramme werden mit dem Reagens besprayed, 7 min auf 85° C erhitzt und nach kurzer Behandlung mit Wasserdampf in eine Schwefelwasserstoff-Atmosphäre gebracht. Die P-haltigen Areale erscheinen dann als tiefblaue Flecke.

7. Ausschneiden der P-haltigen Areale im Chromatogramm, feuchte Veraschung und Bestimmung des P-Gehalts nach BERENBLUM und CHAIN unter Benutzung des Elektrocolumeters ELKO II von Zeiß Opton mit Filter S 75 (Licht der Wellenlänge 750 mμ). Die Werte für ATP und ADP werden dann direkt aus dem P-Gehalt der Areale errechnet.

1. Die papierchromatographische Aufarbeitung von Trichloressigsäure-Extrakten aus coffeinverkürzten Muskeln (Kontraktur bei 20° C).

a) *Befunde nach Einwirkung des I. Lösungsmittels.* Durch Anwendung des I. Lösungsmittels läßt sich der anorganische P der Muskelextrakte

(bestehend aus echtem anorganischen P + dem — in den Trichloressigsäure-Extrakten aufgespaltenen — Kreatin-P) von den wichtigsten organischen Phosphorsäure-Estern trennen: *ATP, ADP und die phosphorylierten Zucker bleiben während 4 Std. Einwirkung des I. Lösungsmittels als ziemlich geschlossenes Feld im Bereich der Startlinie sitzen; dagegen wandert der anorganische P in dieser Zeit 8–10 cm von der Startlinie weg.* Fast der gesamte säurelösliche Phosphor der Muskeln ist nach Einwirkung des I. Lösungsmittels in diesen beiden Arealen wiederzufinden. Die spezielle Verteilung ist jedoch im Frosch- und Kröten-Rectus in sehr charakteristischer Weise verschieden (vgl. Tab. 1): In den Krötenmuskeln dominieren die organischen P-Verbindungen an der Startlinie; in den Froschmuskeln hat dagegen die anorganische P-Fraktion (anorg. P + Kreatin-P) mengenmäßig das Übergewicht. Der Quotient $\frac{\text{organischer P an der Startlinie}}{\text{anorg. P} + \text{Kreatin-P}}$ lag z. B. beim M. rectus von 16 Kröten stets beträchtlich über 1,0 (Mittelwert 1,44), beim M. rectus von 20 Temporarien regelmäßig unter 1,0 (Mittelwert 0,74).

Tabelle 1. *Verteilung des säurelöslichen Phosphors im M. rectus von Temporarien und Kröten nach Anwendung des I. Lösungsmittels.*

	organischer P in Nähe d. Startlinie μ mol/g Muskel	anorganischer P + Kreatin-P μ mol/g Muskel	Quotient $\frac{\text{organ. P}}{\text{anorg. P}}$	Anzahl der Tiere
M. rectus abdom. von R. temporaria	13,2	17,8	0,74	20
M. rectus abdom. von Kröten (<i>Bufo vulgaris</i>)	21,4	14,8	1,44	16

Trotz dieser Verschiedenheiten reagierten die M. recti von Kröten und Temporarien übereinstimmend bei einer Coffein-Kontraktur ($\frac{1}{2}\%$ Coffein, $2\frac{1}{2}$ min, 20°C) mit einer Abnahme des organischen P an der Startlinie und mit einer Zunahme des anorganischen P; der Quotient sank dabei im coffeinverkürzten Kröten-Rectus unter Umständen auf unter 1,0 ab. *Bei der Coffein-Kontraktur im Temperaturbereich von 20°C wurden also offensichtlich organische P-Verbindungen aufgespalten.* Schon die einfache UV-Photographie der Chromatogramme nach Anwendung des I. Lösungsmittels (vgl. Abb. 1) legte den Verdacht eines ATP-Zerfalls nahe: Die Extrakte aus coffeinverkürzten Muskeln enthielten nämlich regelmäßig eine neue UV-absorbierende Verbindung, offenbar IMP (Inosinsäure), für deren Existenz sich in den UV-Bildern der Extrakte normaler Muskeln kein Anhaltspunkt fand. Dagegen wurde AMP

(Adenylsäure) als Zwischenprodukt des ATP- und ADP-Zerfalls anscheinend so schnell zu IMP desaminiert, daß sichtbare Mengen von AMP in den Chromatogrammen nicht gefunden werden konnten. Schon LOHMANN (2) hat auf die rasche Desaminierung von AMP in Froschmuskeln aufmerksam gemacht.

b) *Befunde nach Einwirkung des I. und II. Lösungsmittels.* Durch das II. Lösungsmittel wird ATP von ADP getrennt. Die UV-Photographien der Chromatogramme von Muskelextrakten (vgl. Abb. 2) zeigen dann nach 24 Std Anwendung des II. Lösungsmittels 2 UV-absorbierende Flecke, den



Abb. 1. UV-Photographien von Chromatogrammen nach Anwendung des I. Lösungsmittels. Teil A gibt das Chromatogramm eines bei 0° C Coffein-verkürzten Temporarien-Rectus und des dazugehörigen Kontrollmuskels wieder. Der Extrakt aus dem kontrahierten Muskel unterscheidet sich — was für die Versuche bei 0° C charakteristisch ist — nicht in sichtbarer Weise von dem Extrakt des Kontrollmuskels. — Teil B zeigt das Chromatogramm eines bei 20° C Coffein-verkürzten Temporarien-Rectus und des dazugehörigen Kontrollmuskels: Im Extrakt des bei 20° C kontrahierten Muskels sind erhebliche Mengen IMP schon im UV-Bild sichtbar. Die Pfeile bezeichnen die Startlinie.

größeren UV-Fleck A_1 und den schwächeren UV-Fleck A_2 (vgl. FLECKENSTEIN u. JANKE). Bekannte Testpräparate von ATP und ADP lokalisieren sich genau an der gleichen Stelle und stimmen auch in ihren sonstigen Eigenschaften (P-Gehalt, Ribose-Gehalt) mit den beiden Flecken überein. Es ist also kein Zweifel möglich, daß im Chromatogramm von Extrakten aus normalen Frosch- und Krötenmuskeln der UV-Fleck A_1 praktisch aus ATP und der UV-Fleck A_2 praktisch aus ADP besteht.

In Abb. 2 sind mit dem bloßen Auge keine sehr deutlichen Unterschiede zwischen dem — jeweils im Duplikat angelegten — Chromatogramm

eines coffeinverkürzten Muskels und dem Chromatogramm des paarigen Kontrollmuskels festzustellen. Vor allem ist keine stärkere Abschwächung von UV-Fleck A_1 beim coffein-kontrahierten *M. rectus* zusehen, was auf einen ATP-Zerfall schließen ließe. Dagegen war der Phosphorgehalt von UV-Fleck A_1 im Chromatogramm des coffeinkontrahierten Muskels im Vergleich zum Kontrollmuskel erheblich herabgesetzt; Diese Diskrepanz findet eine einfache Erklärung: Nach Anwendung beider Lösungsmittel lokalisiert sich auch IMP an der Stelle von UV-Fleck A_1 . Im Chromatogramm des coffeinverkürzten Muskels liegt also ATP an der gleichen Stelle wie das ebenfalls UV-absorbierende Zerfallsprodukt IMP (vgl. Abb. 2 links). Die UV-Absorption von UV-Fleck A_1 ist daher trotz des verminderten ATP-Gehalts wenig verändert; nur der P-Gehalt von UV-Fleck A_1 ist stark reduziert.

Der wahre ATP-Gehalt von UV-Fleck A_1 des Coffein-Muskels läßt sich aber ohne Schwierigkeit berechnen; dabei wird nur angenommen, a) daß die ursprüngliche ATP-Konzentration des Coffein-Muskels vor der Kontraktur gleich groß ist, wie die ATP-Konzentration des Kontrollmuskels, und b) daß alles AMP zu IMP desaminiert wird.

Es gilt dann:

$$I. \frac{P_{ATP}}{93} = \frac{P_{ATP'}}{93} + \frac{P_{IMP'}}{31} + \frac{P_{ADP'} - P_{ADP}}{62}$$

$$II. P_{IMP'} = P_{A_1} - P_{ATP'}$$



Abb. 2. UV-Photographie der Chromatogramme eines Rectus-Paares nach Anwendung beider Lösungsmittel. Die Position von UV-Fleck A_1 im Chromatogramm des Kontroll-Rectus stimmt mit der Lage bekannter Testpräparate von ATP, die Position von UV-Fleck A_2 mit der Lage von ADP überein. IMP, das sich während der Coffein-Kontraktur bei 20° C bildet, lokalisiert sich jedoch ebenfalls an der Stelle von UV-Fleck A_1 . Im Chromatogramm des Coffein-Muskels liegt also ATP an gleichen Ort wie sein Zerfalls-Produkt IMP. (Nähere Erörterungen im Text.)

Aus den Gleichungen I/II ergibt sich:

Wahrer ATP-Phosphor des Coffein-Muskels ($P_{ATP'}$) =

$$\frac{3}{2}P_{A_1} - \frac{1}{2}P_{ATP} + \frac{3}{4}(P_{ADP'} - P_{ADP}).$$

Dabei bedeutet; P_{ATP} = ATP-Phosphor/g Kontroll-Muskel;

$P_{ATP'}$ = ATP-Phosphor/g Coffein-Muskel;

P_{ADP} = ADP-Phosphor/g Kontroll-Muskel;

$P_{ADP'}$ = ADP-Phosphor/g Coffein-Muskel;

$P_{IMP'}$ = IMP-Phosphor/g Coffein-Muskel;

P_{A_1} = Phosphor von UV-Fleck A_1 /g Coffein-Muskel.

Die Analysenergebnisse von 6 Muskelpaaren in Tab. 2 zeigen, daß die coffeinverkürzten *M. recti* bei einer mittleren Verkürzungsarbeit von 162 gcm/g Muskel innerhalb $2\frac{1}{2}$ min fast die Hälfte ihres ATP-Bestandes verloren: Während der mittlere ATP-Gehalt von 6 Kontrollmuskeln etwa $2,13 \mu\text{mol ATP/g Muskel}$ betrug, wiesen die coffeinkontrahierten Muskeln im Mittel $0,93 \mu\text{mol ATP/g}$ weniger, d. h. nur noch etwa $1,20 \mu\text{mol ATP/g Muskel}$ auf. Dabei sank auch der Quotient ATP/ADP von etwa 2,0 im Ruhemuskel auf etwa 1,0 im kontrahierten Muskel ab. Der ADP-Gehalt der Coffeinmuskeln stieg dagegen nur unwesentlich um etwa $0,12 \mu\text{mol/g}$ im Mittel an. Auffällig stark war die Zunahme der anorganischen P-Fraktion (echter anorg. P + Kreatin-P); sie erhöhte sich in den kontrahierten Muskeln um $3,62 \mu\text{mol P/g Muskel}$.

Beim Abbau von $0,93 \mu\text{mol ATP}$ zu $0,12 \mu\text{mol ADP} + 0,81 \mu\text{mol IMP}$ werden $0,12 \mu\text{mol} + 2 \times 0,81 \mu\text{mol}$ anorganischer P (zusammen $1,74 \mu\text{mol}$ anorg. P/g Muskel) freigesetzt. Nimmt man dazu noch den anorganischen Phosphor, der bei der Abnahme der „Dritten Fraktion“ (vgl. FLECKENSTEIN u. JANKE) in den Kontrakturmuskeln anfallen dürfte ($0,77 \mu\text{mol/g Muskel}$) so wäre mit insgesamt $2,5 \mu\text{mol}$ anorg. P/g Muskel über $\frac{2}{3}$ des tatsächlich beobachteten Phosphat-Anstiegs erklärt. In den meisten Versuchen war jedoch die Zunahme des anorganischen P so groß, daß noch andere P-Ester als Phosphat-Quelle in Betracht gezogen werden müssen (vermutlich phosphorylierte Zucker usw.).

2. Die papierchromatographische Aufarbeitung von Trichloressigsäure-Extrakten aus coffeinverkürzten Muskeln (Kontraktur bei 0°C).

Auch in $\frac{1}{2}\%$ igen Coffein-RINGER-Lösungen von 0°C verkürzt sich der Kröten- und Temporari-Rectus im Laufe von $2\frac{1}{2}$ min sehr beträchtlich. Im Mittel aus 6 Versuchen wurde eine Kontraktionsarbeit von $108,6 \text{ gcm/g Muskel}$ gemessen, d. h. etwa $\frac{2}{3}$ der innerhalb $2\frac{1}{2}$ min bei 20°C abgegebenen Arbeit (162 gcm/g Muskel).

a) Befunde nach Einwirkung des I. Lösungsmittels. Die Chromatogramme aus der Versuchsserie bei 0°C ließen schon im UV-Bild erhebliche Unterschiede gegenüber den Chromatogrammen aus der Versuchsreihe bei 20°C erkennen (vgl. Abb. 1): Während die Coffein-Kontraktur bei 20°C stets unter Bildung von IMP verlief, traten bei der Coffein-Kontraktur in der Kälte keine im Chromatogramm sichtbaren IMP-Mengen auf. Schon dieser Befund wies darauf hin, daß der starke, bei

Tabelle 2. Coffein-Kontraktur des *M. rectus* mit ATP-Zerfall bei 20° C¹ (1/2% Coffein-RINGER-Lösung).

Vers. Nr.	Temperatur	Frischgewicht mg	Einwirkungs- dauer min	ATP μmol/g	ADP μmol/g	ATP ADP	„Dritte“ Fraktion ³ μmol P/g	Anorganisches Phosphat μmol/g	Arbeit gem	Arbeit gem/g
1 T	20°C	149	2 1/2	1,092 ²	1,260	0,87	1,335	20,40	24,8	166
		137	—	1,810	1,240	1,46	2,860	20,08		
9 T	20°C	104	2 1/2	1,608 ²	1,508	1,07	0,861	22,00	21,4	206
		127	—	2,100	1,230	1,72	2,275	17,50	—	—
10 T	20°C	124	2 1/2	0,976 ²	0,802	1,22	0,277	20,03	21,6	174
		114	—	1,990	0,952	2,09	0,677	15,16	—	—
15 T	20°C	99	2 1/2	1,050 ²	1,160	0,91	0,970	17,08	22,9	232
		127	—	2,040	0,925	2,21	1,897	15,75	—	—
23 K	20°C	144	2 1/2	1,035 ²	1,090	0,95	0,807	21,07	17,0	118
		159	—	2,400	0,844	2,84	1,234	14,35	—	—
24 K	20°C	184	2 1/2	1,425 ²	1,170	1,22	1,203	18,70	14,2	77
		185	—	2,420	1,084	2,23	1,130	14,73	—	—
Mittelwerte		Coffein-Muskeln RINGER-Muskeln		1,20 ² 2,13	1,17 1,05	1,04 2,09	0,91 1,68	19,88 16,26	— —	162 —

¹ Sämtliche in der Tabelle angegebenen Werte sind das Mittel aus Doppelbestimmungen, bzw. doppelt angelegten Chromatogrammen.

² Die ATP-Werte der Coffein-Muskeln wurden jeweils aus dem Phosphorgehalt von UV-Fleck A₁ mit Hilfe der oben angegebenen Formel errechnet.

³ Die „Dritte Fraktion“ ist bisher noch nicht identifiziert; sie enthält leicht hydrolysierbaren P (vgl. FLECKENSTEIN u. JANKE).

T = Temporarien-Rectus K = Kröten-Rectus

Tabelle 3. *Coffein-Kontraktur des M. rectus ohne ATP-Zerfall bei 0°C (1/2% Coffein-RINGER-Lösung).*

Vers.- Nr.	Tempe- ratur		Frisch- gewicht mg	Ein- wirkungs- dauer min	ATP $\mu\text{mol/g}$	ADP $\mu\text{mol/g}$	ATP ADP	„Dritte Fraktion“ $\mu\text{mol P/g}$	Anorganisches Phosphat $\mu\text{mol/g}$	Arbeit gcm	Arbeit gcm/g
7 T	0°C	Coffein-Muskel	135	2 1/2	2,165	0,734	2,95	2,100	20,53	20,5	152
		RINGER-Muskel	141	—	2,120	0,750	2,83	2,788	20,32	—	—
13 T	0°C	Coffein-Muskel	138	2 1/2	1,980	0,897	2,21	1,972	20,95	20,7	150
		RINGER-Muskel	121	—	1,880	1,087	1,73	2,366	19,65	—	—
14 T	0°C	Coffein-Muskel	136	2 1/2	1,865	1,180	1,58	1,600	13,34	16,8	123,5
		RINGER-Muskel	124	—	1,797	1,354	1,33	1,358	12,68	—	—
16 T	0°C	Coffein-Muskel	185	2 1/2	2,390	1,093	2,19	1,450	18,00	13,9	75
		RINGER-Muskel	188	—	2,440	1,220	2,00	2,220	18,30	—	—
22 K	0°C	Coffein-Muskel	212	2 1/2	2,505	0,948	2,64	1,084	16,87	16,3	77
		RINGER-Muskel	191	—	2,440	0,825	2,96	1,074	14,63	—	—
25 K	0°C	Coffein-Muskel	167	2 1/2	2,120	0,662	3,20	1,755	14,64	12,4	74
		RINGER-Muskel	187	—	2,570	0,920	2,80	0,820	18,54	—	—
		Mittelwerte			Coffein-Muskeln	0,92	2,48	1,66	17,39	—	108,6
					RINGER-Muskeln	1,03	2,28	1,77	17,34	—	—

¹ Sämtliche in der Tabelle angegebenen Werte sind das Mittel aus Doppelbestimmungen bzw. doppelt angelegten Chromatogrammen.

T = Temporarien-Rectus

K = Kröten-Rectus.

20° C zu beobachtende, ATP-Zerfall durch die Kälte erheblich abgeschwächt wird. Auch die Summe der — im Bereich der Startlinie zurückbleibenden — organischen P-Verbindungen zeigte bei der Coffein-Kontraktur in der Kälte nur eine schwache Abnahme gegenüber den Kontrollmuskeln; dementsprechend waren keine starken Anstiege des anorganischen P (echter anorg. P + Kreatin-P) nachweisbar (vgl. Tab. 3).

b) Befunde nach Anwendung des I. und II. Lösungsmittels. In Tab. 3 sind die Werte für ATP, ADP und die „Dritte Fraktion“ wiedergegeben, so wie sie aus dem P-Gehalt der ausgeschnittenen und veraschten Areale nach Anwendung beider Lösungsmittel zu berechnen waren. Bei 6 Rectuspaaren enthielten die coffeinkontrahierten Muskeln ebenso wie die dazu gehörigen Kontrollmuskeln im Mittel 2,2 μ mol ATP. ADP nahm bei der Kontraktur nicht zu und der Quotient ATP/ADP sank dabei nicht ab. Die Coffein-Kontraktur kann sich also tatsächlich bei 0° C ohne stärkere Aufspaltung organischer P-Ester ausbilden.

3. Der Einfluß der Coffein-Kontraktur auf den Kreatinphosphat-Gehalt des M. rectus.

Aus den Werten für die Gesamtfraktion (echter anorg. P + Kreatin-P) in Tab. 2 und 3 ist nicht zu erkennen, ob und wieviel Kreatinphosphat bei der Coffein-Kontraktur gespalten wird. Es wurde daher in

Tabelle 4. Einfluß der Coffein-Kontraktur auf den Kreatinphosphat-Gehalt des Temporari-Rectus bei 20° C (1/2% ige Coffein-RINGER-Lösung).

Vers.- Nr.	Tempe- ratur		Frisch- gewicht mg	Einwir- kungs- dauer min	Kreatin- phosphat μmol/g	Arbeit gcm	Arbeit gcm/g
C ₂₃	20° C	Coffein-Muskel	95	2½	0,427	18,1	190,5
		RINGER-Muskel	96		7,960	—	—
C ₂₄	20° C	Coffein-Muskel	102	2½	2,660	20,5	201
		RINGER-Muskel	104		8,280	—	—
C ₂₅	20° C	Coffein-Muskel	76	2½	Spur	14,8	195
		RINGER-Muskel	79		4,920	—	—
C ₂₆	20° C	Coffein-Muskel	107	2½	Spur	13,3	124,2
		RINGER-Muskel	99		6,100	—	—
C ₂₇	20° C	Coffein-Muskel	115	2½	0,065	10,9	94,8
		RINGER-Muskel	102		6,780	—	—
C ₂₈	20° C	Coffein-Muskel	116	2½	0,236	14,0	121
		RINGER-Muskel	109		6,050	—	—
Mittelwerte			Coffein- Muskel		0,57	Diffe- renz 6,11 μmol/g	154,4
			RINGER- Muskel				—
					6,68		

Tabelle 5. *Einfluß der Coffein-Kontraktur auf den Kreatinphosphat-Gehalt des Temporarien-Rectus bei 0° C (1/2%ige Coffein-RINGER-Lösung).*

Vers.- Nr.	Tempe- ratur		Frisch- gewicht mg	Einwir- kungs- dauer min	Kreatin- phosphat μmol/g	Arbeit gcm	Arbeit gcm/g
C ₁₉	0° C	Coffein-Muskel	127	2½	4,590	9,6	75,7
		RINGER-Muskel	149	—	7,440	—	—
C ₂₀	0° C	Coffein-Muskel	123	2½	1,615	11,7	92,2
		RINGER-Muskel	115	—	6,820	—	—
C ₂₁	0° C	Coffein-Muskel	109	2½	2,120	8,1	74,0
		RINGER-Muskel	101	—	4,030	—	—
C ₂₂	0° C	Coffein-Muskel	117	2½	2,102	8,7	74,6
		RINGER-Muskel	133	—	6,100	—	—
C ₂₉	0° C	Coffein-Muskel	79	2½	2,800	7,2	91,0
		RINGER-Muskel	88	—	7,430	—	—
Mittelwerte			Coffein- Muskel		2,65	Diffe- renz 3,71 μmol/g	81,5
			RINGER- Muskel		6,36		—

besonderen Versuchen auch das Verhalten von Kreatinphosphat bei der Coffein-Kontraktur von 20° C und 0° C geprüft. Die Kreatinphosphat-Bestimmungen erfolgten nach der Methode von EGGLETON u. EGGLETON; die Ergebnisse sind in der Tab. 4 und 5 wiedergegeben. *Tatsächlich zerfielen bei der Coffein-Kontraktur in jedem Falle erhebliche Mengen Kreatinphosphat:* Bei 20° C sank z. B. der mittlere Kreatinphosphat-Gehalt im Laufe von 2 1/2 min von 6,68 μmol auf 0,57 $\mu\text{mol/g}$ Muskel, d. h. um über 6 μmol ab; in 2 Versuchen verschwand Kreatinphosphat praktisch vollständig aus den kontrahierten Muskeln. Auch bei 0° C war der Kreatinphosphat-Abfall beträchtlich: Die Werte sanken von 6,36 μmol auf 2,65 $\mu\text{mol/g}$ Muskel, d. h. um 3,71 μmol im Mittel ab. In keinem Fall war der Kreatinphosphat-Gehalt bei 0° C ganz erschöpft.

Besprechung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Coffein-Kontraktur des Frosch- und Kröten-Rectus bei 2 1/2 min Einwirkung einer 1/2%igen Coffein-RINGER-Lösung von 20° C von einem massiven ATP-Zerfall begleitet ist, während die Coffein-Kontraktur bei 0° C unter sonst gleichen Bedingungen ohne Veränderung des ATP- und ADP-Spiegels im Muskel verläuft. Lediglich Kreatinphosphat wird sowohl bei 20° C als auch bei 0° C abgebaut.

Die durch Coffein hervorgerufenen Veränderungen des Muskels sind anscheinend bei 0° C weniger intensiv als bei 20° C. Dementsprechend betrug der bei 0° C erreichte Verkürzungsgrad — und damit die Kontraktionsarbeit — in den Versuchen der Tab. 2 und 3 etwa $\frac{2}{3}$, bei den Versuchen von Tab. 4 und 5 etwa die Hälfte des bei 20° C erreichten Verkürzungsgrades. Dies könnte damit zusammenhängen,

- a) daß Coffein in der Kälte langsamer in den Muskel eindiffundiert,
- b) daß die — dem Coffein-Effekt zugrunde liegenden — chemischen oder physicochemischen Umsetzungen in der Kälte langsamer als in der Wärme verlaufen,
- c) daß sich eine $\frac{1}{2}\%$ ige Coffein-Lösung bei 0° C an der Grenze der Sättigung befindet und zu Ausflockungen neigt. Es ist daher in den Lösungen von 0° C unter Umständen nicht die volle Coffein-Konzentration von $\frac{1}{2}\%$ wirksam.

Trotz dieser Einschränkungen ist die Coffein-Kontraktur bei 0° C dem Wesen nach nichts anderes als die Coffein-Kontraktur bei 20° C; denn auch die Verkürzungen bei 0° C sind schwere Schädigungs-Kontrakturen, die weder durch Auswaschen noch durch anodische Polarisation mit Gleichstrom rückgängig gemacht werden können.

Es bleibt also die Tatsache bestehen, daß unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen eine völlig anodenresistente Coffein-Kontraktur des Kröten- und Temporarien-Rectus sich auch ohne ATP-Schwund ausbilden kann. *Das von BENDALL postulierte tiefe Absinken des ATP-Spiegels kann also nicht zur Erklärung der Coffein-Kontraktur bei 0° C herangezogen werden.* Die vorliegenden Befunde lassen vielmehr erkennen,

- a) daß die von der coffeinkontrahierten Muskelfaser entwickelte Spannung *keine* Funktion des ATP-Gehalts im Faserinnern ist,
- b) daß das Absinken des ATP-Spiegels bei 20° C wahrscheinlich eine — in der Wärme relativ rasch eintretende — *Folge* der Coffein-Kontraktur darstellt. Dieses Absinken des ATP-Spiegels scheint erst dann einzusetzen, wenn die Kreatinphosphat-Bestände beinahe erschöpft sind.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß auch bei der reversiblen Verkürzung des M. rectus (tetanische Reizung, KCl-Kontraktur) keine Veränderungen der ATP und ADP-Werte — selbst nicht im Zustand maximaler Kontraktion — zu finden sind (FLECKENSTEIN u. JANKE⁷). Umgekehrt konnte durch Vergiftung des M. rectus in Dinitrophenol-RINGER-Lösung 1 : 10000 bei 20° C u. U. eine deutliche ATP-Abnahme und ein völliger Abbau von Kreatinphosphat hervorgerufen werden, ohne daß irgendwelche Verkürzungs-Phänomene zur Beobachtung kamen.

Experimentell gesichert ist bisher bei praktisch allen Formen von Kontraktion und Kontraktur nur die enge Abhängigkeit des Verkürzungsaktes von der elektrischen Entladung der Fasern. Dementsprechend scheint auch Coffein — als irreversibel depolarisierender, membran-destruierender Kontrakturstoff (vgl. SCHÜLLER) — seine motorischen Effekte hauptsächlich durch Entladung des Membranpotentials auszuüben. Dagegen ist die ATP-Theorie der Coffein-Kontraktur in der Version von BENDALL mit den gefundenen Tatsachen nicht in Einklang zu bringen.

Zusammenfassung.

1. Die Coffeinverkürzung des M. rectus von Temporarien und Kröten entwickelt sich bei 20° C unter massivem Zerfall von ATP, dagegen bei 0° C ohne Abnahme des ATP-Gehalts. Das Absinken des ATP-Spiegels kann demnach nicht als Ursache, sondern nur als eventuelle Begleiterscheinung der Coffein-Kontraktur gelten.

2. Entscheidend für die Kontraktur ist nach unseren früheren Ergebnissen die durch Coffein verursachte anodenresistente Depolarisation des Muskels. Dieser Zusammenbruch des Membranpotentials entwickelt sich unter massiver K⁺-Freisetzung und beruht auf einer irreversiblen Destruktion der Membranen bzw. der ganzen Faser.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Heidelberger Akademie der Wissenschaften sind wir für die Förderung der Untersuchungen sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur.

BENDALL, J. R.: The shortening of rabbit muscle during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. *J. of Physiol.* **114**, 71 (1951). — BERENBLUM, I., and E. CHAIN: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochemic. J.* **32**, 295 (1938). — EGGLESTON, L. V., and R. HEMS: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. *Biochemic. J.* **52**, 156 (1952). — EGGLESTON, G. P., and P. EGGLESTON: A method of estimating phosphagen and some other phosphorus compounds in muscle tissue. *J. of Physiol.* **68**, 193 (1929). — ERDÖS, T.: *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* **3**, 51 (1943); zit. nach A. SANDOW: *Ann. Rev. Physiol.* **11**, 297 (1949). — ¹ FLECKENSTEIN, A.: Über den primären Energiespeicher der Muskelkontraktion. *Pflügers Arch.* **250**, 643 (1948). — Korreferat: Kaliumsensibilisatoren. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **212**, 54 (1950). — ² FLECKENSTEIN, A., u. A. HARDT: Der Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetica und Antihistaminikörper — ein Permeabilitätsproblem. *Klin. Wschr.* **1949**, 360. — ³ FLECKENSTEIN, A., E. WAGNER u. K. H. GÖGGL: Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit der Muskellänge vom Membranpotential. Der Wirkungsmechanismus kontrakturverhütender Lokalanästhetica. *Pflügers Arch.* **253**, 38 (1950). — ⁴ FLECKENSTEIN, A., H. HILLE u. W. E. ADAM: Aufhebung der Kontraktur-Wirkung depolarisierender Katelektrotonica durch Repolarisation im Anelektrotonus. Die Anode als Antagonist von Acetylcholin, Cholin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kalium- und Rubidium-Salzen usw. *Pflügers Arch.* **253**, 264 (1951). — ⁵ FLECKENSTEIN, A., u. F. RICHTER: Weitere Untersuchungen über die Aufhebung der Kontraktur-Wirkung von Acetylcholin, Cholin, Neurin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kaliumchlorid und Rubidiumchlorid durch den Anelektrotonus. *Pflügers Arch.* **257**, 1 (1953). — ⁶ FLECKENSTEIN, A., u. E. GERLACH: Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen K⁺-Gehaltes. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **219**, 531 (1953). — ⁷ FLECKENSTEIN, A., u. J. JANKE: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafenen Froschmuskel. *Pflügers Arch.* **258**, 177 (1953). — HARDT, A., u. A. FLECKENSTEIN: Über die Kaliumabgabe des Froschmuskels bei Einwirkung kontrakturerzeugender Stoffe und die Hemmung der Kaliumabgabe durch kontrakturverhütende Lokalanästhetica. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **207**, 39 (1949). —

¹ LOHMANN, K.: Über das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. *Biochem. Z.* **202**, 466 (1928); **203**, 164, 172 (1928). — ² LOHMANN, K.: Vergleichende Untersuchungen über das Coferment der Milchsäurebildung und der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.* **241**, 81 (1931). — MARKHAM, R., u. J. D. SMITH: *Biochemic. J.* **45**, 294 (1949). — SCHÜLLER, J.: Über den Antagonismus einiger Lokalanaesthetica gegenüber dem Coffeineffekt am Muskel. *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **105**, 299 (1925). — SZENT-GYÖRGYI, A.: *Chemistry of muscular contraction*. New York: Academic Press Inc. 1948.

Professor Dr. A. FLECKENSTEIN, Heidelberg, Pharmakol. Institut d. Univ.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i.Br.
(Direktor: Prof. Dr. L. HEILMEYER).

Zur Physiologie und Pathologie des Speichereisens.

1. Mitteilung.

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ferritins.

Von

W. KEIDERLING und F. WÖHLER.

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Dezember 1953.)

Das Speichereisen stellt bekanntlich jene Eisenfraktion im menschlichen und tierischen Organismus dar, welche als verfügbares Reserve-material für die Hämoglobin- und Zellhämoglobinbildung in den Speicherorganen bereitliegt. Die neueren Untersuchungen haben Aufschluß über die verschiedenen Formen erbracht, in denen das Speichereisen in den Vorratskammern vorliegt. Es ist intracellulär als *Ferritin* oder *Hämosiderin* in Leber, Milz und den übrigen Zellen des Reticuloendothels eingelagert.

Das Ferritin ist aus einem spezifischen Eiweißkörper, dem *Apo ferritin*, und aus 17—24% Eisen aufgebaut. Einen wesentlich höheren Eisengehalt von 29—36% weist demgegenüber Hämosiderin auf, welches im übrigen aber chemisch mit dem Ferritin nahe verwandt ist. Vergleicht man jedoch die Eigenschaften der beiden Speicherformen, so stellt Ferritin die leicht mobilisierbare und für den Organismus daher auch wichtigere Speicherform des Eisens dar. Darüber hinaus beansprucht es noch insofern besonderes Interesse, als es bei der Aufnahme des Eisens aus dem Darmkanal wichtige Funktionen erfüllt. Das den Mucosazellen zuströmende Ferroeisen wird nämlich nach Eintritt in die Zelle in die Ferriform überführt und verbindet sich auch hier mit Apoferritin, welches von der Zelle zu diesem Zweck synthetisiert wird. Ist die Mucosazelle mit Ferritin gesättigt, so findet eine weitere Eisenresorption aus dem Darmkanal nicht mehr statt und der Organismus bleibt durch Errichtung des „Mucosablockes“ vor einer Eisenüberschwemmung bewahrt. Nach Abgabe an die Blutbahn wird das Eisen an einen weiteren Eiweißkörper, das *Transferrin*, gebunden und über die Pfortader transportiert, wo es als Ferritin abgelagert wird und als Vorratsform auf Abruf bereitliegt. Auf Grund seiner engen und vielseitigen Verknüpfungen mit den Eisenumsatzungen des Organismus ist das Ferritin in den Mittelpunkt der Vorgänge im Eisenstoffwechsel gestellt, und ein Studium der quantitativen Verhältnisse erscheint daher von besonderem Interesse. In der Tat sind auch in der neueren Eisenstoffwechselforschung immer wieder Versuche unternommen worden, welche auf Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode des Ferritins abzielten.

Ferritin ist zuerst von V. LAUFBERGER aus Pferdemicke isoliert und mittels Cadmiumsulfat kristallisiert dargestellt worden. Die Untersuchungen LAUFBERGERS wurden später in Deutschland von R. KUHN, N. A. SÖRENSEN u. L. BIRKHOFER und

in neuerer Zeit von C. H. SCHWIETZER und in Amerika besonders von S. GRANICK u. a. fortgeführt. Dabei konnte Ferritin in den Speicherorganen aller bisher untersuchten Säugetiere nachgewiesen, jedoch nicht immer in kristallisierter Form dargestellt werden. Kaninchenleber z. B. liefert keine Ferritinkristalle. Für den quantitativen Nachweis des Ferritins werden große Mengen an Ausgangsmaterial benötigt. Für klinische oder experimentelle Eisenstoffwechselstudien erwiesen sich die quantitativ-chemischen Methoden in der bisherigen Form daher wenig geeignet. S. GRANICK hat deshalb eine semiquantitative Methode angegeben, welche Ferritin in der Duodenalschleimhaut des Meerschweinchens nachzuweisen gestattet. Diese Methode liefert zwar keine absoluten Ergebnisse, soll sich aber für vergleichende Untersuchungen brauchbar erweisen und wurde von H. BRAUNSTEINER, E. GISINGER und F. PAKESCH zum Ferritinnachweis in der Rattenleber benutzt.

In eigenen Vorversuchen wurde die semiquantitative Methode, welche auf dem Prinzip beruht, einen etwa $40\ \mu$ dicken Gefrierschnitt mit 10%iger Cadmiumsulfatlösung zu versetzen und 24 Std später den Mittelwert der pro Gesichtsfeld anfallenden Ferritinkristalle bei 200facher Vergrößerung zu bestimmen, ebenfalls an Rattenleber und Rattenmilz überprüft. Bei vergleichender Auszählung von Serienschnitten ergaben sich in der Anzahl der Ferritinkristalle jedoch von Schnitt zu Schnitt außergewöhnliche Schwankungen, so daß Versuche zur Ausarbeitung einer quantitativen Methode unternommen wurden, welche exakte Ferritinbestimmungen auch in kleineren Ausgangsmaterialien wie z. B. in Organen kleinerer Laboratoriumstiere oder in menschlichen Leberpunktionen gestattet.

Isolierung des Ferritins. Die Isolierung des Ferritins aus Leber, Milz oder anderen Organgeweben zielt darauf ab, andere Eisen-Proteinverbindungen wie z. B. Hämoglobin, Transferrin, Hämosiderin und Zellhämine durch geeignete Maßnahmen abzutrennen und zu eliminieren.

Eine kleine Menge frisch entnommenen Organgewebes wird zu diesem Zwecke mit der doppelten Gewichtsmenge von Aqua dest. in Kubikzentimeter (p_H 7) versetzt und im Homogenisator bei 12000 Umdrehungen pro Minute über 2–5 min homogenisiert. Das Homogenat wird 2 Std bei Zimmertemperatur stengelassen und anschließend zentrifugiert und filtriert. Der Rückstand wird nochmals mit der gleichen Menge Aqua dest. versetzt und wiederum zentrifugiert und filtriert. Nach Vereinigung beider Filtrate wird im Wasserbad unter ständigem Rühren bis auf 80°C erhitzt. Beim Erhitzen fällt bereits ein großer Teil der im Filtrat enthaltenen Proteine aus, während Ferritin in Lösung bleibt. Die ausgefällten Proteine werden mittels Nutsche (Porengröße $3\ \mu$) abgetrennt und verworfen. Dem Filtrat wird Ammonsulfat p. a. bis zu einer Konzentration von 15% zugesetzt. Hierbei fallen weitere Proteine aus, welche durch Abzentrifugieren entfernt werden. Ständen nur geringe Mengen Ausgangsmaterial zur Verfügung, so wurde auf die Ammonsulfatfällung verzichtet. Das restliche Filtrat wird nach 24stündiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser im Vakuum bis nahezu zur Trockne eingeengt und mit Aqua dest. je nach Menge des Ausgangsmaterials beliebig auf 0,2–4 ml aufgefüllt. 0,01 ml dieser Lösung wird nach dem Verfahren von W. GRASSMANN u. K. HANNIG auf einen 4,5 cm breiten Papierstreifen Whatman Nr. 1 aufgetragen und in der Elektrophoresekammer bei 110 Volt unter Benützung eines Veronal-Natriumpuffers bei p_H 8,6 über etwa 14 Std elektrophoretisch getrennt.

Nach Anfärbung mit Amidoschwarz (gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B p.a. in Methanol, welches 10% Eisessig enthält) zeigte sich eine Eiweißfraktion, welche von der Auftragsstelle in Richtung der Anode etwa mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Alpha-Globuline gewandert war. In Abb. 1 sind 3 Elektropherogramme zum Vergleich gegenübergestellt. Das obere Pherogramm entstammt einer nach dem angegebenen Verfahren hergestellten Lösung aus Pferdemilz, das untere zeigt Pferdeserum allein. Im mittleren Pherogramm wurde Pferdeserum mit der angegebenen Lösung gemeinsam aufgetragen. Wie man sieht, wandert

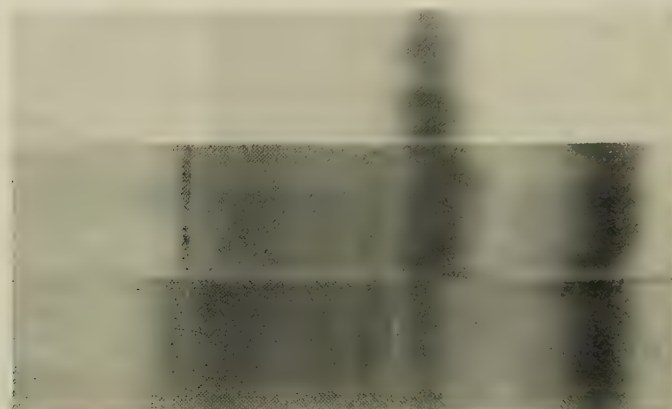


Abb. 1. Vergleich der Elektropherogramme von angereicherter Ferritinlösung aus Pferdemilz, Pferdeserum mit Zusatz der angereicherten Ferritinlösung und Pferdeserum allein. (Veronal-Natrium Puffer pH 8,6; 110 Volt, 14 Std; Anfärbung mit Amidoschwarz.)

die isolierte Eiweißkomponente mit der Geschwindigkeit der Alpha-Globuline, wie es von H. C. SCHWIETZER früher schon für Ferritin beschrieben wurde.

Identifizierung der isolierten Eiweißkomponente. Nachdem vorausgehend gezeigt werden konnte, daß sich aus Leber und Milz von Pferd und Ratte eine bestimmte Eiweißkomponente von den übrigen Eiweißkörpern abtrennen läßt, erschien es notwendig, die Identität der isolierten Fraktion mit Ferritin zu beweisen.

Kristallisierte Ferritindarstellung. Durch Versetzen der angereicherten Eiweißlösung mit einer 10%igen Cadmiumsulfatlösung konnten schöne goldbraun-leuchtende Kristalle erhalten werden. Abb. 2 zeigt die Ferritinkristalle, wie sie aus Pferdemilz (Abb. 2a), Rattenleber (Abb. 2b) und menschlicher Leber (Abb. 2c) dargestellt wurden. Wie die vergleichende Betrachtung zeigt, gehören die Ferritinkristalle aus Pferdemilz dem kubischen System an und treten in Oktaederform auf, während die Kristalle aus Rattenleber und menschlicher Leber eine mehr rundliche Erscheinungsform aufweisen.

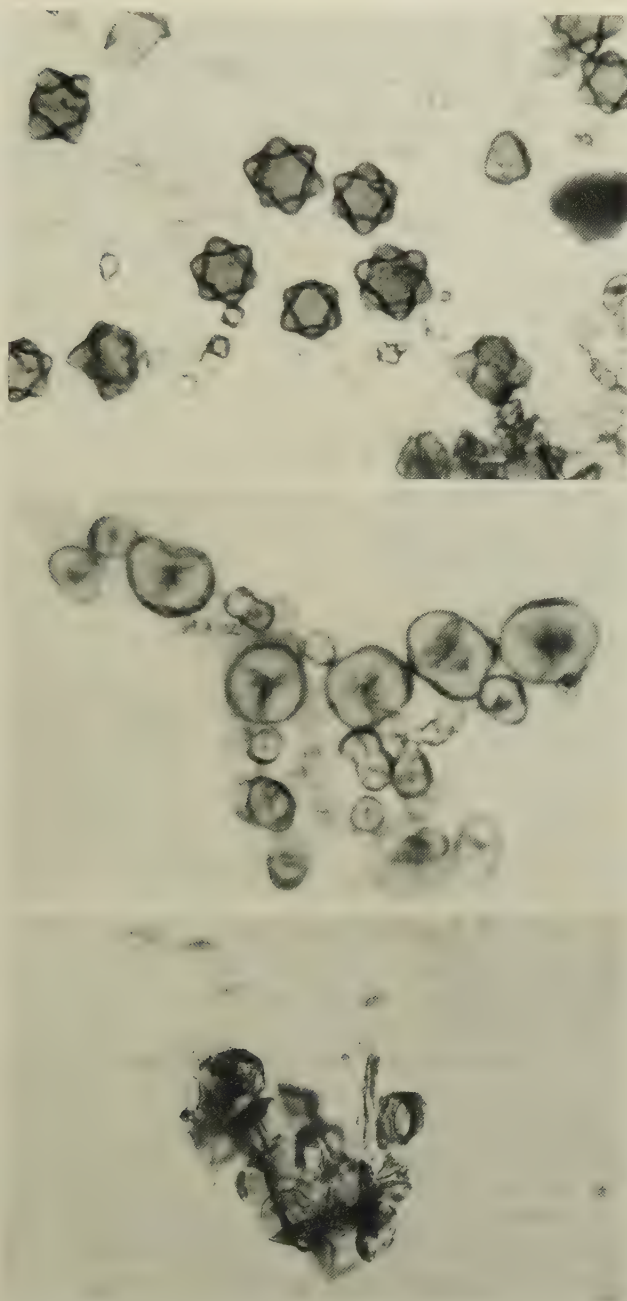


Abb. 2. Ferritinkristalle aus Pferd milz (2a), Rattenleber (2b) und menschlicher Leber (Haemochromatose) (2c).

Identitätsbeweis mit radioaktivem Eisen. Nachdem P. F. HAHN, S. GRANICK, W. F. BALE u. L. MICHEALIS in tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt haben, daß nach parenteraler Verabreichung von radioaktivem Ferriammoniumcitrat 80% der applizierten Gesamtaktivität in Form von Ferritin in der Leber gespeichert wird, war es naheliegend, die Identität der isolierten Eiweißkomponente mit Ferritin auch noch mittels radioaktiven Eisens zu beweisen. Einer Albinoratte wurde zu diesem Zwecke 1,5 mg radioaktives Ferrosulfat, bestehend aus Fe 59 mit einer Halbwertszeit von 47 Tagen und Fe 55 mit einer Halbwertszeit von

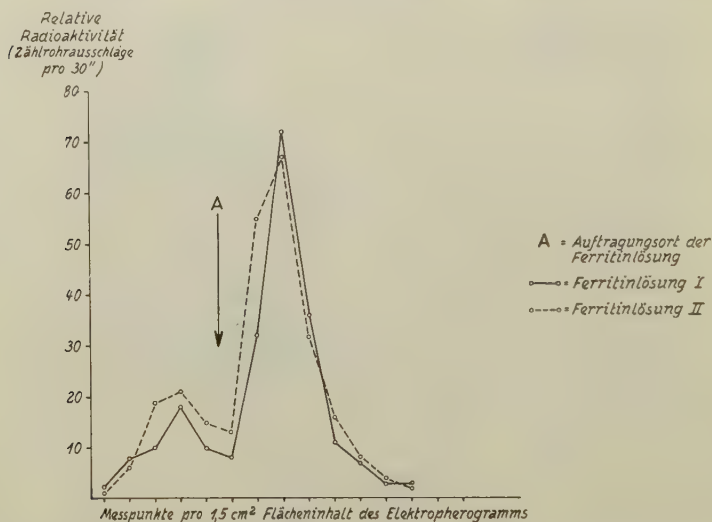


Abb. 3. Graphische Darstellung der relativen Radioaktivität von 2 angereicherten Ferritinlösungen aus Rattenleber im Elektropherogramm.

4 Jahren intramuskulär in den linken Oberschenkel injiziert. Die Gesamtaktivität des injizierten Eisens betrug $40 \mu\text{C}$. Fünf Tage nach der Injektion wurde das Tier getötet und das Ferritin in der beschriebenen Weise aus Leber und Milz isoliert. Das Elektropherogramm wurde zunächst unter Benutzung einer Bleifolie, welche mit einem Fenster in der Größe von $0,5 \times 3 \text{ cm}$ versehen war, und somit die schrittweise Abtastung des Papierstreifens gestattete, hinsichtlich seiner Strahlenaktivität untersucht. Dabei wurde so vorgegangen, daß die Ausschläge des Geiger-Zählrohres für die einzelnen Flächeninhalte von $1,5 \text{ cm}^2$ für die Zeiteinheit von 30 sec abgelesen wurden. Die Ablesungswerte sind nach Abzug des Leerwertes in Abb. 3 graphisch dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, steigt die relative Radioaktivität im Elektropherogramm an der Stelle der isolierten Eiweißkomponente steil an, was auf ihre spezifische Bindungsfähigkeit für das applizierte radioaktive Eisen und somit auf ihre

Identität mit Ferritin hinweist. Bei genauer Betrachtung der Abbildung findet sich eine weitere eisenhaltige Eiweißkomponente, welche gegenüber Ferritin eine geringere Aktivität aufweist und vom Auftragungsort in Richtung der Kathode wandert. Diese eisenhaltige Eiweißkomponente entspricht, wie später noch gezeigt wird, dem Cytochrom.

Die Identität der isolierten Eiweißkomponente mit Ferritin ließ sich weiterhin noch durch den Nachweis der Strahlungsaktivität der Ferritin-



Abb. 4. Ferritinkristalle aus Rattenleber (links Darstellung der radioaktiven Ferritinkristalle, rechts Nachweis ihrer Strahlungsaktivität im Autoradiogramm).

kristalle beweisen. Abb. 4 zeigt links die Ferritinkristalle, welche aus der angereicherten Eiweißlösung mittels Cadmiumsulfat dargestellt wurden. Die rechte Seite der Abbildung demonstriert die Strahlungsaktivität derselben Kristalle im Autoradiogramm. Auf Grund der angeführten Untersuchungsergebnisse kann kein Zweifel darüber bestehen, daß es sich bei der isolierten Eiweißkomponente um Ferritin handelt.

Quantitative Bestimmung des Ferritineisens im Elektropherogramm. Die quantitative Bestimmung des Ferritineisens kann auf 2 Wegen erfolgen, einmal durch Herausschneiden des die Ferritinfraktion enthaltenden Papiersegmentes und anschließenden photometrischen Nachweis des freigesetzten Eisens, zum anderen durch den direkten Eisennachweis im Elektropherogramm durch Anfärbung mit einem Eisenreagenz und nachfolgende photoelektrische Auswertung im Elphorgerät.

Für den ersten Weg erweist sich die o-Phenanthrolinmethode von L. HEILMEYER u. K. PLÖTNER geeignet. Das o-Phenanthrolin bildet bekanntlich mit zweiwertigem Eisen eine äußerst stabile rotgefärbte Komplexverbindung. Das Ferritin-eisen, welches als dreiwertiges Hydroxydphosphat im Ferritin vorliegt, muß durch Hydrolyse mit 6 n-Salzsäure unter Erwärmung bis auf 100° C aus dem Ferritin freigesetzt und in die zweiwertige Form überführt werden. Die Verwendung einer 6 n-Salzsäure bedingt insofern eine Modifikation der o-Phenanthrolinmethode, als zur Neutralisierung der salzsauren Eisenlösung wesentlich größere Mengen konzentrierten Ammoniaks benötigt werden, als in der Originalvorschrift angegeben ist. Für die Überführung des Eisens in die zweiwertige Form wurde außerdem in Abweichung von der Originalmethode eine 4% ige Hydrochinon- oder 10% ige Natriumhydrosulfitlösung verwandt. Die quantitative Bestimmung der rotgefärbten o-Phenanthrolin-Eisen-Komplex-Verbindung kann in üblicher Weise spektralphotometrisch im Zeißschen Stufenphotometer unter Benützung des Spektralfilters S 50 und der Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 50 mm erfolgen, wobei regelmäßig ein Blindwert mitbestimmt wird.

Die beschriebene Methode der indirekten Ferritin-Eisen-Bestimmung ist für Routineuntersuchungen zu kompliziert und zeitraubend, so daß Versuche zum direkten Eisennachweis auf dem Papierstreifen durch Anfärbung mit einem Eisenreagenz unternommen wurden. In Vorversuchen ergab sich, daß das o-Phenanthrolin für den direkten Eisennachweis auf dem Papierstreifen nicht geeignet ist, da das freigesetzte Eisen durch das wiederholte Aufsprühen der für die o-Phenanthrolinreaktion benötigten Reagenzien auf dem Papierstreifen verläuft, so daß eine relative breite und verschmierte rotgefärbte o-Phenanthrolin-Eisenbande resultiert. Zur Vereinfachung des Eisennachweises wurde deshalb nach Reagenzien gesucht, welche auf dem Papierstreifen mit Ferri-Eisen gefärbte Komplexverbindungen eingehen. Unter diesen Reagenzien mußte Kalium-Rhodanid ausscheiden, da sich die kupferrotgefärbte Komplexverbindung als zu instabil erwies. Zufriedenstellende Ergebnisse wurden demgegenüber mit Kaliumferrocyanid erzielt, welches mit Ferri-Eisen einen intensiv blau-gefärbten und sehr stabilen Ferri-Ferro-Cyanid-Komplex bildet. Es zeigte sich, daß der blaue Farbkomplex selbst durch längeres Wässern sowie Verbringen in ein Transparenzbad und nachfolgende Behandlung mit Äther zur Wiederentfernung der Transparenzlösung aus dem Papierstreifen in seiner Farbintensität nicht beeinträchtigt wird.

Bei der Kalium-Ferrocyanidmethode wird das Ferritin-Eisen im Elektrophogramm durch vorsichtiges Aufsprühen von 6 n-Salzsäure und nachfolgender Trocknung bei 100° C im Trockenschrank aus seiner Eiweißbindung gelöst. Im Bereich der Ferritinfraktion erscheint dabei ein hellgelb gefärbter Ferrichloridstreifen, welcher bei Aufsprühen einer 2% igen Kaliumferrocyanidlösung in Abhängigkeit von der Ferritiseisenkonzentration eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung erfährt. Nach Trocknung wird der Papierstreifen zwecks Entfernung überschüssiger Salzsäure für 5—10 min in ein Wasserbad verbracht. Anschließend wird der Streifen nach erneuter Trocknung in einem Transparenzbad, welches aus einer Mischung von Paraffinöl und α -Bromnaphthalein besteht und einen Brechungsindex von n_D 1,51 aufweist, transparent gemacht. Aus der photoelektrischen Bestimmung der

blauen Farbkonzentration im Elphorgerät (Firma Bender u. Hobein, München) kann der Ferritineisengehalt an Hand einer Eichkurve ermittelt werden.

Zur Aufstellung der Eichkurve wurde von der angereicherten Ferritinlösung zunächst die Gesamt-Eisen-Konzentration nach der Methode von

L. HEILMEYER u. H. PLÖTNER in der beschriebenen Modifikation bestimmt. Nach Ermittlung der Gesamt-Eisen-Konzentration wurde aus der Ferritinstamm-
lösung eine Verdünnungsreihe derart hergestellt, daß in jeweils $0,1 \text{ cm}^3$ Ferritin-
lösung aufsteigende Eisenmengen von 1, 2, 5, 10, 20, 50, 75, 100 und 150 Gamma
Eisen enthalten waren. Von den verschiedenen Verdünnungen wurden Elektro-
pherogramme hergestellt und das Ferri-
tineisen nach vorausgegangener Hydro-
lyse in der beschriebenen Weise mit
Kaliumferrocyanid sichtbar gemacht.
Die mit Kaliumferrocyanid angefärbten
Pherogramme sind in Abb. 5 in der
Reihenfolge ihrer aufsteigenden Eisen-
konzentration dargestellt. Wie man sieht,
nimmt die Farbintensität des blauen
Ferri-Ferro-Cyanidkomplexes parallel
zur Eisenkonzentration zu.

Zur Anfertigung der Eichkurve muß die Farbintensität des blauen Farbkom-
plexes der verschiedenen Pherogramme
zur Eisenkonzentration in Beziehung ge-
setzt werden. Zu diesem Zwecke wurde
die Farbintensität der Pherogramme pho-
toelektrisch im Elphorgerät bestimmt.
Die Ablesungswerte wurden in üblicher
Weise auf Millimeterpapier übertragen
und die erhaltenen Flächeninhalte der
GAUSS'schen Kurven mittels eines
OTT-Planimeters Nr. 29852 (Bender und
Hobein, München) bestimmt. Die er-
mittelten Werte wurden dann in ein
Koordinatensystem eingetragen, dessen
Ordinate von den Flächeninhalten der

Fe-Konzentration
der Ferritinlösung

1 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

2 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

5 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

10 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

20 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

50 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

75 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

100 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

150 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$

Abb. 5. Darstellung des Ferritineisens im Elektro-
pherogramm nach Anfärbung mit Kaliumferrocyanid.

GAUSS'schen Kurve und dessen Abszisse von den Ferritineisenkonzentrationen gebildet werden. Wie Abb. 6 zeigt, steigt die erhaltene Eichkurve bis zu einer Eisenkonzentration von 20 Gamma/0,01 cm³ linear an. Nur in höheren Konzentrationsbereichen von mehr als 20 Gamma pro 0,01 cm³ weicht die Eichkurve von der Idealkurve ab und läßt einen parabelförmigen Verlauf erkennen. Bis zu Eisenkonzentrationen von 20 Gamma/0,01 cm³ läßt sich demnach der Ferritineisengehalt von Lösungen mit unbekanntem Ferritingehalt bestimmen.

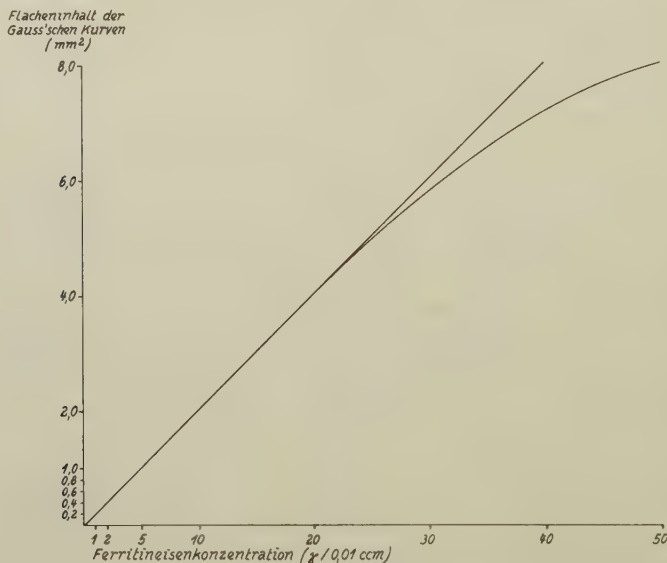


Abb. 6. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung des Ferritineisens im Elektropherogramm mit Kaliumferrocyanid.

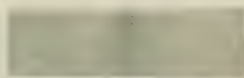
Quantitative Bestimmung des Apoferritins im Elektropherogramm. Da der Eisengehalt im Ferritin bekanntlich Schwankungen zwischen 17 und 24% unterworfen ist, erweist sich zur Ermittlung des Ferritingehaltes einer Lösung auch die quantitative Bestimmung des Eiweißanteiles (d. h. des Apoferritins) als notwendig. Der Stickstoffgehalt des Ferritins, welcher sich aus dem Stickstoffgehalt der Aminosäuren und Nucleinsäuren zusammensetzt, beträgt nach übereinstimmenden Befunden von v. LAUFBERGER wie auch von R. KUHN, N. A. SÖRENSEN u. L. BIRKHOFFER rund 10%. Der Apoferritingehalt einer Ferritinlösung läßt sich demnach bei Kenntnis des Gesamtstickstoffgehaltes vermittels des elektrophoretischen Trennverfahrens in relativen Prozentsätzen errechnen. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes wurde nach KJELDAHL in 1 cm³ angereicherter Ferritinlösung durchgeführt. Von der gleichen Ferritinlösung wurde dann eine Verdünnungsreihe derart hergestellt, daß in 0,01 cm³ Lösung auf-

steigende Eiweißmengen enthalten waren. In der Praxis kann dabei so vorgegangen werden, daß die Pherogramme der einzelnen Verdünnungen jeweils zur Bestimmung des Ferritin-Eisengehaltes und des Apoferritinhaltens benutzt werden, indem entweder von derselben Konzentration von vornherein 2 Pherogramme hergestellt werden oder 1 Pherogramm in 2 gleiche Teile der Länge nach geteilt wird. Zur Apoferritinbestimmung wird der eine Streifen mit Amidoschwarz, der andere in der beschriebenen Weise mit Kaliumferrocyanid angefärbt. In Abb. 7 sind die mit Amidoschwarz angefärbten Pherogramme der Verdünnungsreihe unter Angabe der jeweiligen Eiweißkonzentration dargestellt, welche kjeldahlo-metrisch ermittelt wurde. Wie man sieht, steigt auch die Farbintensität des Apoferritinstreifens parallel zum Eisengehalt an. In den höheren Konzentrationen wird dabei eine stärkere Anfärbung des Papierstreifens im Bereich der zurückgelegten Wanderungsstrecke erkennbar, was darauf hinweist, daß in der angereicherten Ferritinlösung auch noch Proteine mit anderer Wanderungsgeschwindigkeit enthalten waren. Das Apoferritin unterscheidet sich aber von den anderen Eiweißkörpern nicht allein durch seine Wanderungsgeschwindigkeit, sondern auch durch qualitative Unterschiede in der Anfärbbarkeit mit Amidoschwarz. Während die anderen Eiweißkörper in Abhängigkeit von ihrer Konzentration mehr oder weniger intensiv blau-gefärbt erscheinen, ist der Ferritinstreifen durch eine charakteristische blau-grüne Farbtönung gekennzeichnet.

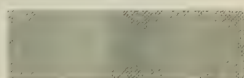
Bei der elektrophoretischen Auswertung der Pherogramme erweist es sich als notwendig, den Flächeninhalt der ergänzten GAUSS'schen Kurven des Apoferritins in relativen Prozenten der Gesamtfläche zu berechnen, wobei der Gesamtflächeninhalt der Gesamtstickstoffkonzentration in g % gleichgesetzt wurde. Setzt man zur Aufstellung der Eichkurve die Flächeninhalte der ergänzten GAUSS'schen Kurven des Apoferritins zur Eiweißkonzentration in Beziehung, so ergibt sich, wie Abb. 8 zeigt, eine Gerade, h. d. die Farbintensität der angefärbten Apoferritin-

Ferritineiweißkonzentration der Ferritinlösung.

6 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



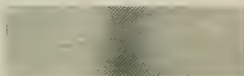
10 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



12,5 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



25 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



37,5 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



50 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



75 $\gamma/0,01 \text{ cm}^3$



Abb. 7. Darstellung des Apoferritins im Elektropherogramm nach Anfärbung mit Amidoschwarz.

streifen steigt in Abhängigkeit von der Eiweißkonzentration linear an. Der Apoferritingehalt einer Ferritinlösung läßt sich demnach an Hand der Eichkurve ermitteln.

Berechnung des Ferritingehaltes. Aus der Bestimmung der Apoferritin- und der Ferritin-Eisen-Konzentration einer Lösung kann der Ferritin-gehalt eines Organes berechnet werden, wie noch an einem Beispiel demonstriert werden soll. Durch Aufarbeitung von 10 g einer 850 g schweren Pferdemilch wurde eine angereicherte Ferritinlösung mit einem Endvolumen von 1 cm³ erhalten. Der kjeldahlometrisch ermittelte Gesamteiweißgehalt dieser angereicherten Ferritinlösung betrug 1,41 g%, was

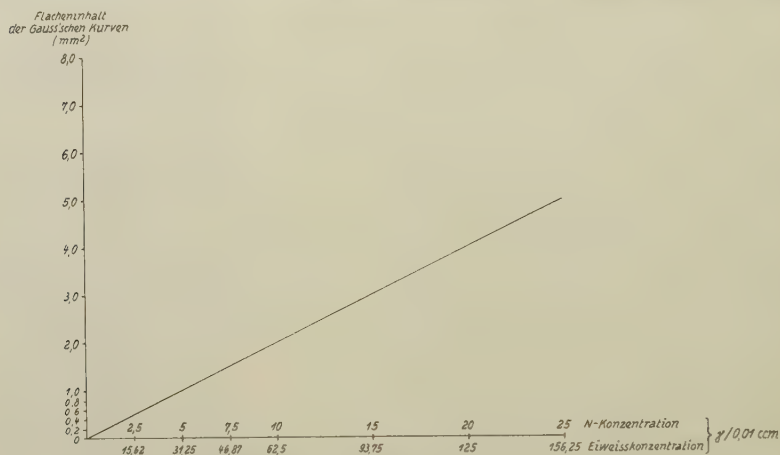


Abb. 8. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung des Apoferritins im Elektropherogramm.

einem Stickstoffgehalt von 0,22 g% entspricht. 0,01 cm³ dieser Lösung wurden elektrophoretisch bei p_H 8,6 getrennt und anschließend mit Amidoschwarz angefärbt. Bei der Auswertung im Elphorgerät ergab sich für die Eiweißlösung ein Gesamtflächeninhalt von 4 mm², welcher gleich 100% gesetzt wurde. Der Flächeninhalt der ergänzten GAUSSschen Kurve des Apoferritins betrug 1,2 mm², d. h. 30% der aufgetragenen Eiweißlösung bestand aus Apoferritin. Wie ein Vergleich mit der Eichkurve des Apoferritins in Abb. 8 zeigt, besteht eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den elektrophoretisch und kjeldahlometrisch ermittelten Werten für Stickstoff und Gesamteiweiß. Einem Flächeninhalt von 4 mm² entspricht nämlich in der Eichkurve ein N-Gehalt von 0,20 g% bzw. ein Gesamteiweißgehalt von 1,25 g%. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Apoferritin, wo für einen Flächeninhalt von 1,2 mm² ein N-Gehalt von 0,0615 g% und ein Gesamteiweißgehalt von 0,38 g% gefunden wurden. Die Ergebnisse beider Methoden weisen demnach eine Differenz von 9,5—11,6% auf. Wenn der N-Gehalt des Apoferritins

0,062 g% beträgt, so sind in der zur elektrophoretischen Bestimmung benutzten Menge von 0,01 cm³ 0,0000062 g N enthalten. Der N-Gehalt des Endvolumens der angereicherten Eiweißlösung berechnet sich demnach auf 0,00062 g. Da im Ferritin bekanntlich rund 10% N enthalten sind, beträgt der Ferritingehalt im Endvolumen der Lösung bzw. in 10 g Pferdemilz 0,0062 g und im 850 g schweren Gesamtorgan 0,52 g.

Der Eisengehalt der angereicherten Ferritinlösung wurde quantitativ-chemisch nach L. HEILMEYER u. H. PLÖTNER und elektrophoretisch

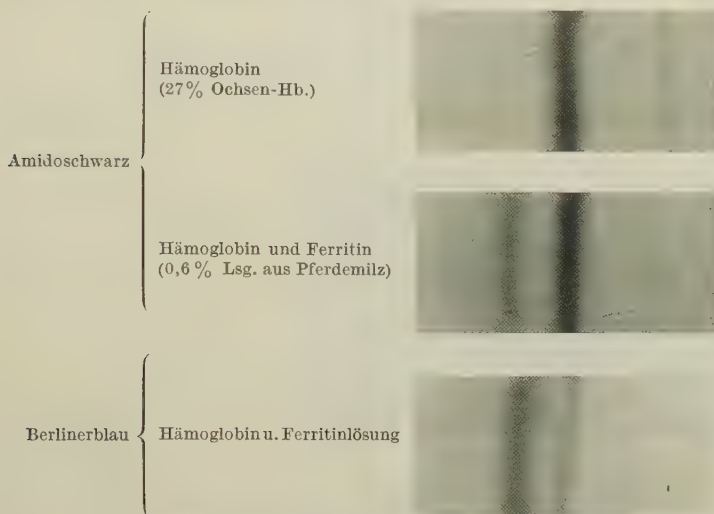


Abb. 9. Elektropherogramme von Hämoglobin- und Ferritinlösungen nach Anfärbung mit Amidoschwarz und Kaliumferrocyanid.

nach Anfärbung mit Kaliumferrocyanid in der beschriebenen Weise bestimmt. Bei der quantitativ-chemischen Bestimmung, welche in 0,1 cm³ vorgenommen wurde, ergab sich für das Endvolumen der Lösung von 1 cm³ ein Eisengehalt von 1,223 mg. Bei der elektrophoretischen Methode betrug der Flächeninhalt der GAUSS'schen Kurve 2,4 mm², was in der Eichkurve des Ferritineisens in Abb. 6 einem Eisengehalt von 12 Gamma/0,01 cm³ bzw. von 1,2 mg im Endvolumen der Lösung entsprach. Die Ergebnisse der beiden Methoden differierten demnach um 1,9%. Berechnet man den Ferritineisengehalt des Gesamtorganes, so ergibt sich für 850 g Pferdemilz ein Eisengehalt von 102 mg, d. h. im Ferritin waren 19,5% Eisen enthalten.

Diskussion.

Nachdem die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, daß Ferritin von anderen Proteinen durch geeignete Fraktionierungs- und elektrophoretische Trennverfahren isoliert und durch Ermittlung des

Apoferritin- und Ferritineisengehaltes quantitativ bestimmt werden kann, erhebt sich die Frage, inwieweit beim elektrophoretischen Ferritinnachweis andere eisenhaltige Proteinverbindungen wie z. B. Hämoglobin, Hämosiderin oder die verschiedenen Zelhämamine miterfaßt werden.

Schon früher ist von anderen Autoren die Ausschaltung des Hämoglobins durch Viviperfusion der Versuchstiere mittels eisenfreier Tyrode Lösung (K. H. SCHÄFER) versucht und empfohlen worden. Dieses Verfahren ist jedoch technisch kompliziert und im Enderfolg unbefriedigend und muß vor allem für Untersuchungen von



Abb. 10. Elektropherogramme von Hämosiderin und Ferritinlösungen nach Anfärbung mit Amidoschwarz und Kaliumferrocyanid.

menschlichem Organgewebe ausscheiden. Es war deshalb das Verhalten der verschiedenen eisenhaltigen Proteinverbindungen im elektrischen Feld von besonderem Interesse.

Wie vergleichende elektrophoretische Untersuchungen zeigten, wandert das Hämoglobin wie Ferritin in Richtung der Anode, zeichnet sich jedoch durch eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit aus. In Abb. 9 sind die Pherogramme von Hämoglobin und Ferritinlösungen nach Anfärbung mit Amidoschwarz und Kaliumferrocyanid zum Vergleich gegenübergestellt. Nach Anfärbung mit Kaliumferrocyanid läßt der Ferritinstreifen eine intensive Blaufärbung erkennen, während das organisch gebundene Eisen keine Reaktion zeigt. Der Hämoglobinstreifen nimmt bei Hydrolyse mit 6 n-Salzsäure lediglich eine bräunliche Farbtönung an, was durch Methämoglobinbildung bedingt ist.

Hämoglobin scheidet demnach als störende Komponente beim elektrophoretischen Ferritinnachweis aus.

Um auch das Verhalten des Hämosiderins im elektrischen Feld zu prüfen, wurden 200 g Pferdemilz nach der Methode von M. BEHRENS u. TH. ASHER aufgearbeitet. Vom anfallenden Hämosiderin wurden in üblicher Weise Pherogramme hergestellt und mit Amidoschwarz und Kaliumferrocyanid angefärbt. Wie Abb. 10 zeigt, läßt das Hämosiderin

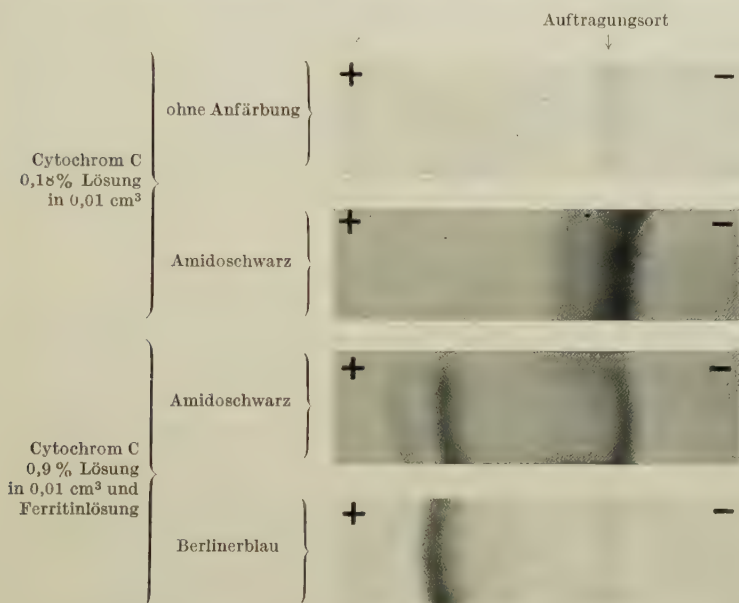


Abb. 11. Elektropherogramme von Cytochrom C und Ferritinlösungen nach Anfärbung mit Amidoschwarz und Kaliumferrocyanid.

gegenüber dem Ferritin charakteristische Unterschiede erkennen. Es bleibt am Auftragungsort liegen, färbt sich mit Kaliumferrocyanid sehr intensiv und mit Amidoschwarz nur gering an. Die Ursache für dieses Verhalten dürfte in dem wesentlich höheren Eisen- und geringen Eiweißgehalt zu suchen sein. Die charakteristischen Eigenschaften dieser beiden Verbindungen lassen sich auch nachweisen, wenn man Ferritinlösung und Hämosiderinsuspension gemeinsam aufträgt und elektrophoretisch trennt. Man sieht also, daß auch das Hämosiderin als störender Faktor beim elektrophoretischen Ferritinnachweis nicht in Betracht kommt.

Schließlich wurde unter den Vertretern der Zellhämine noch das Verhalten von Cytochrom C geprüft. Wie die vergleichende Betrachtung der erhaltenen Pherogramme einer Cytochrom-C- und einer Ferritinlösung in Abb. 11 zeigt, wandert Cytochrom-C im Unterschied zum Ferritin in Richtung der Kathode und zeichnet sich gleichzeitig durch eine geringere

Wanderungsgeschwindigkeit aus. Cytochrom färbt sich wie Hämoglobin mit Kaliumferrocyanid nicht an, da auch hier das Eisen in fester organischer Bindung vorliegt. Bei der elektrophoretischen Analyse von etikettierten Ferritinlösungen aus Rattenleber, welche nach vorausgegangener parenteraler Applikation von 1,5 mg radioaktiven Ferrosulfats erhalten wurden, zeigte die Kurve der relativen Radioaktivität in Abb. 3 einen zweigipfligen Verlauf. Die höchste Radioaktivität fand sich an der Stelle des Ferritins, welches auch mit Kaliumferrocyanid eine intensive Blaufärbung ergab. Der kleinere, in Richtung der Kathode liegende Gipfel färbte sich demgegenüber mit Kaliumferrocyanid nicht an und gehört offenbar dem Cytochrom oder einem anderen Zellhäm in an. Man sieht also, daß das parenteral verabreichte Eisen relativ rasch in die eisenhaltigen Zellfermente eingelagert wird. Über das Verhalten anderer Zellhämine im elektrischen Feld sind zur Zeit noch Untersuchungen im Gange.

Zusammenfassung.

Es wird über eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ferritins berichtet, welche auf dem Prinzip beruht, Ferritin aus frisch homogenisiertem Leber-, Milz- oder anderem Organgewebe unter Anwendung geeigneter Fraktionierungsverfahren zu isolieren und anzureichern. Nach elektrophoretischer Trennung der in der angereicherten Lösung enthaltenen Proteine läßt sich Apoferritin durch Anfärbung mit Amidoschwarz und nachfolgende Auswertung im Elphorgerät quantitativ bestimmen. In gleicher Weise kann die Bestimmung des Ferritineisens auf den Papierstreifen nach vorausgegangener Hydrolyse durch Anfärbung mit Kaliumferrocyanid erfolgen. Aus den beiden Werten läßt sich der Ferritingehalt im Organgewebe und der prozentuale Eisengehalt des Ferritins berechnen. Die Methode ist auch zum Ferritinnachweis in Organen kleinerer Laboratoriumstiere geeignet, so daß Untersuchungen über quantitative Beziehungen zwischen dem Ferritin und anderen Eisenfraktionen ermöglicht werden. Das unterschiedliche Verhalten verschiedener Eisenproteinverbindungen im elektrischen Feld und gegenüber Kaliumferrocyanid und Amidoschwarz werden abschließend besprochen.

Literatur.

BEHRENS, M., u. TH. ASHER: Isolierung und chemische Untersuchung des Hämosiderins in der Pferdemilz. *Z. physiol. Chem.* **97**, 220 (1933). — BRAUNSTEINER, H., E. GISINGER u. F. PAKESCH: Ferritin, Transferritin und Serumeisen. *Klin. Wschr.* **1952**, 394. — GRANICK, S.: Ferritin. Physikalische und chemische Eigenschaften. *J. of Biol. Chem.* **146**, 451 (1942). — Ferritin IX. Funktion des Ferritins bei der Regulation der Eisenresorption. *J. of Biol. Chem.* **164**, 737 (1946). — Ferritin, seine Eigenschaften und seine Bedeutung für den Eisenstoffwechsel. *Chem. Revue* **38**, 379 (1946). — GRANICK, S., u. P. F. HAHN: Ferritin. Eisenaufnahme durch die Leber und Umwandlung in Ferritineisen. *J. of Biol. Chem.* **155**, 661 (1944).

— GRANICK, S., u. L. MICHAELIS: Ferritin II. Apoferritin aus Pferdemilz. *J. of Biol. Chem.* **149**, 91 (1943). — GRASSMANN, W., K. HANNIG u. M. KNEDEL: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filterpapier. *Dtsch. med. Wschr.* **1951**, 333. — HAHN, P. F., S. GRANICK, W. F. BALE u. L. MICHAELIS: Ferritin, Umwandlung von anorganischem Eisen und Hämoglobineisen und Ferritineisen im tierischen Organismus. Nachweis der Speicherfunktion des Ferritineisens durch radioaktive und magnetische Messungen. *J. of Biol. Chem.* **150**, 407 (1943). — HEILMEYER, L., u. K. PLÖTNER: Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit. Jena: G. Fischer 1937. — KUHN, R., N. A. SÖRENSEN u. L. BIRKHOFFER: Über die Eisenproteine der Milz; der Bauplan des Ferritins. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **73**, 823 (1940). — LAUFBERGER, V.: Über die Kristallisation von Ferritin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**, 1576 (1937). — SCHÄFER, K. H.: Bestimmungen des Eisens in biologischem Material, insbesondere des Nicht-Hämoglobineisens in geringen Organismen durch Phenantrolin als Indikator. *Biochem. Z.* **304**, 417 (1940). — SCHWIETZER, C. H.: Ferritin. Die Bedeutung einiger Proteine für den Eisenstoffwechsel. *Arzneimittel-Forsch.* **1**, 72 (1951).

Dozent Dr. W. KEIDERLING, Med. Univ.-Klinik, Freiburg/Br.

Institut für Pharmakologie und experimentelle Therapie der Universität Catania
(Direktor: Prof. Dr. G. SANFILIPPO).

Pharmakologische Studien über Thiazole.

VII. Mitteilung:

Schutzwirkung der 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure gegenüber experimenteller Äthylalkoholvergiftung.

Von

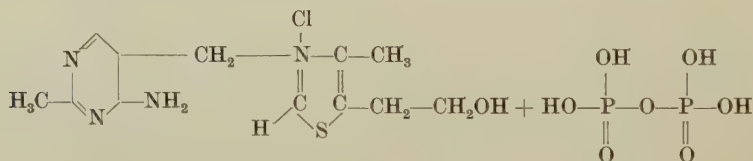
GAETANO DI MAGGIO.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. November 1953.)

Es ist bekannt, daß die biologischen Eigenschaften der Vitamine in Beziehung zu ihrer Anwesenheit im Molekül von Biokatalysatoren stehen, die mit dem lebenden Protoplasma in Wechselwirkung treten.

Im Molekül von Aneurin besitzt das Vorhandensein der OH-Gruppe in der Äthylgruppe des Thiazolrestes eine besondere Bedeutung, indem sie die Veresterung mit Pyrophosphorsäure ermöglicht.



Dadurch entsteht die Cocarboxylase [LOHMANN (2)]. Sie stellt die aktive Form des Vitamins B₁ im Organismus dar [LOHMANN u. SCHUSTER (1), VAN HAMME und andere].

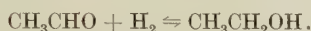
Nach BANGA, OCHOA u. PETERS kommt die Phosphorylierung des Vitamin B₁ (Übergang zum Coenzym) besonders in der Leber und Niere zustande, während nach anderen Autoren diese Reaktion eine Eigenschaft aller kernhaltigen Zellen ist. Nach MÖLLER erfolgt bei oraler Verabreichung von Vitamin B₁ die Bildung der Cocarboxylase möglicherweise bereits in der Darmschleimhaut. Jedenfalls scheint es festzustehen, daß Aneurin nur in freier Form die Zellmembran passiert.

In der Zelle tritt dann die Phosphorylierung ein, indem sich wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen Aneurin und Cocarboxylase gemäß folgender Reaktion einstellt:



Dieses Gleichgewicht unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Insbesondere wurde festgestellt, daß unter anaeroben Bedingungen eine Verschiebung des Gleichgewichts nach links erfolgt (OCHOA) und in diesen Fällen die Verabreichung von Aneurin den Vorgang nach rechts verlagert (GREIG u. GOVIER).

Die Cocarboxylase katalysiert die Decarboxylierung der α -Ketosauren und hat daher die größte Bedeutung für den Ablauf der Zuckeroxydation in ihrer letzten Phase, die von der Brenztraubensäure zum Acetaldehyd (in der Hefe) bzw. zum aktiven Acetat (in der tierischen Zelle) führt. In kleinen Mengen entsteht Acetaldehyd (als „aktiver“ Aldehyd) im Säugetierorganismus. Durch die Alkoholdehydrase der Hefe und Leber wird der Acetaldehyd reversibel in Äthylalkohol umgewandelt (RACKER, BONNICHSEN):



Damit erweist sich das Vitamin B₁ in Gestalt der Cocarboxylase als ein Wirkstoff, der auch in den Vorgang der Bildung von Äthylalkohol aus Kohlenhydraten eingreift.

Aneurin greift noch in eine große Zahl anderer oxydierender Prozesse ein, wie dies aus den Arbeiten von KÜHNAU u. SCHIERING, ABDERHALDEN, RAMOINO u. NOVARO, HESS, BRADDON u. COOPER, RANDOIN u. Mitarb. hervorgeht. PETERS ist der Ansicht, daß das Aneurin Bestandteil einer Oxydase sei, die verschiedene Substrate angreift. LIPMANN hat gezeigt, daß die Cocarboxylase als Coferment fungieren kann, welches die Brenztraubensäure oxydativ zu „aktiver“ Essigsäure abbaut. Auch Äthylalkohol kann über Acetaldehyd im Stoffwechsel zu Essigsäure oxydiert werden (HALD u. JACOBSEN), die dann ihrerseits im Tricarbonsäurezyklus zu CO₂ und H₂O abgebaut wird (LE BRETON, BATELLI u. STERN, CASIER, THOMAS u. DELAUNOIS, DEWAN).

Es scheint also, als ob das Vitamin B₁ in phosphorylierter Form dazu dienen könnte, die aktive Gruppe verschiedener enzymatischer Systeme mit mannigfaltigen Funktionen zu liefern.

Abgesehen von diesen Überlegungen, die die Cocarboxylase mit dem Umsatz des Äthylalkohols verknüpfen, ist es dem Kliniker bekannt, daß Aneurin bei verschiedenen Formen von alkoholischer Polyneuritis therapeutische Wirkungen entfaltet. Bei der Behandlung des Alkoholismus macht man ebenfalls weitgehend Gebrauch von Vitamin B₁ und schon wird in einzelnen Ländern empfohlen, die Einnahme alkoholischer Getränke mit der gleichzeitigen Einnahme von Aneurin zu kombinieren (LECOQ). In diesem Falle ist der erhöhte Aneurinbedarf nicht nur verursacht durch die Stoffwechselsteigerung, die durch den gesteigerten Alkoholkonsum bedingt ist, sondern auch durch die zerstörende Tätigkeit, die diese Substanz als Protoplasmagift auf die Zellstruktur ausübt. Der Alkoholismus bewirkt also eine B₁-Hypovitaminose.

Es ist bekannt, — wie DI MATTEI zuerst nachgewiesen hat — daß verschiedene chemische Agenzien eine Vitaminverarmung im Organismus hervorrufen können.

Es darf endlich nicht vergessen werden, daß der B₁-Vitaminverbrauch für den Organismus um so größer ist, je mehr Nichtfettkalorien zugeführt werden (ARNOLD u. ELVEHJEM). COWGILL hat sogar den künstlichen Zusatz von Aneurin zu solchen Diäten vorgeschlagen.

Wie auch immer die Beziehungen zwischen Vitamin B₁ und Äthylalkohol betrachtet werden mögen, so scheint doch — im Lichte der heutigen Erfahrungen — die Annahme berechtigt, daß bei Alkoholüberdosierung eine Störung der Phosphorylierung des Aneurins eine Rolle spielt.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Tiere, die nur Alkohol erhalten hatten, nahmen schon vom ersten Tag der Behandlung an laufend ab; die Gewichtsverminderung betrug etwa 30% in 15 Tagen (Abb. 1). Sie fraßen oft nicht und machten einen kranken Eindruck.

Die autopsische Prüfung ergab: Geringfügige Hyperämie und Ödem der Meninge und des Gehirns, Lungenemphysem mit subpleuraler Hämorrhagie; Leber weich mit glatter und glänzender Oberfläche; Stauungsniere; Nierenbecken und Uteren o. B. Milz leicht vergrößert, mit glattem glänzendem Perisplenium, weich, Follikel nicht deutlich erkennbar. Magen-Darmkanal, Sexualorgane, Schilddrüse, Herz, Nebennieren o. B.

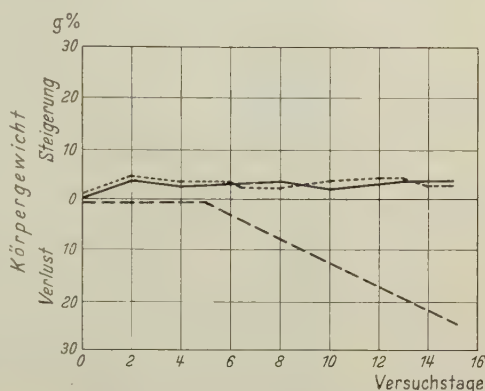


Abb. 1. Äthylalkoholvergiftete Ratten. Änderungen des Körpergewichtes bei der Vergiftung.

— nur Alkohol; — Alkohol + Vitamin B₁;
 Alkohol + 2-amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure,

Histologisch: In der Leber perivaskuläre Infiltrate. Stellenweise Intimaödeme und hämorrhagische Zonen. Atrophie der Leberzellen und

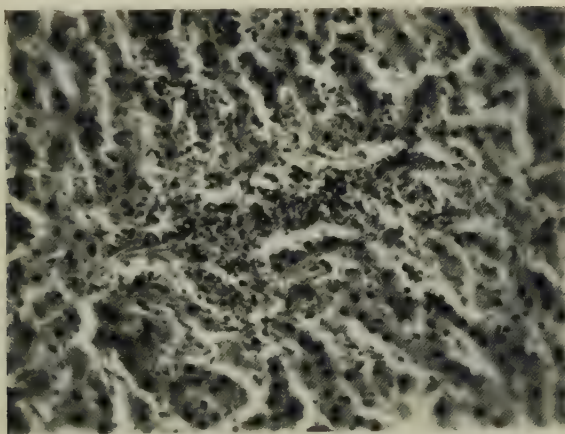


Abb. 2. Leber. Ratten durch Äthylalkohol vergiftet: Hämorrhagische Zone, Atrophie der Leberzellen, leukocytäres Infiltrat. Hämatoxylin-Eosinfärbung; Ok. 4 C, Obkt. 6.

Sinusverbreiterung (Abb. 2 u. 3). Die Läppchen-Zeichnung erschien an vielen Stellen ungeordnet. Andeutungen von Fettspeicherung ließen sich hier und da auffinden.

Nieren: Kongestion der Mark- und Rindenzone. Zonen von fettiger Infiltration waren deutlich erkennbar. Auch in anderen Organen wurden mikroskopische Erscheinungen der Äthylalkoholvergiftung aufgefunden.

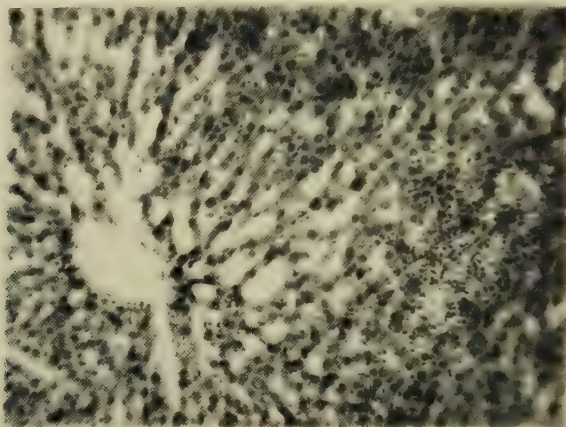


Abb. 3. Leber. Ratten durch Äthylalkohol vergiftet: Atrophie der Leberzellen, Sinusoidesa, lympholeukocytäres Infiltrat. CIACCIO's technische Methode; Ok. 8C, Obkt. 4.

Die durch Alkohol vergifteten und mit Vitamin B₁ behandelten Tiere haben während der ganzen Versuchsperiode keine erkennbaren Störungen gezeigt. Das Körpergewicht blieb konstant, nahm sogar in einigen Fällen

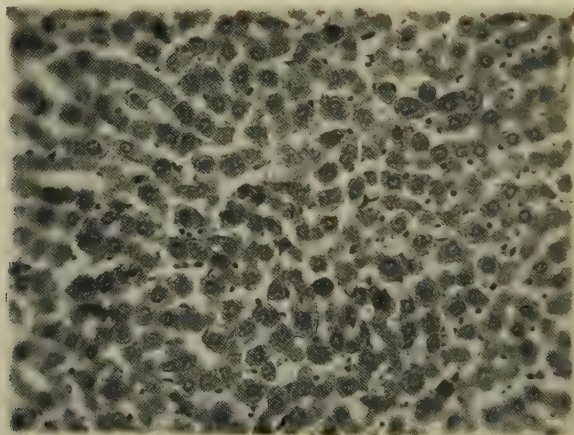


Abb. 4. Leber. Ratten durch Äthylalkohol vergiftet und mit Vitamin B₁ behandelt: Nichts bemerkbar. Analoges Bild bei der 2-amino-5-methylthiazol-4-carbonsäurebehandlung der Äthylalkoholvergiftung. Hämatoxylin-Eosinfärbung; Ok. 4C, Obkt. 6.

zu (um etwa 10% des Anfangsgewichtes) (Abb. 1). Bei der autoptischen Untersuchung wurden keine Organveränderungen festgestellt mit Ausnahme eines leichten Grades von Lungenemphysem mit einigen sub-

pleuralen Hämorrhagien. Bei der histologischen Untersuchung erwies sich die Leber als normal. Atrophische Zonen und Parenchym-Veränderungen fehlten. Nur in einigen Fällen fanden sich perivaskuläre Leukocyten-infiltrate (Abb. 4). Die Nieren und die anderen Organe waren normal.

Auch die durch Alkohol vergifteten und mit 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure behandelten Tiere unterschieden sich autoptisch und histologisch nicht wesentlich von den mit Vitamin B₁ behandelten Alkoholtieren (Abb. 1). Auch die Kontrolltiere wiesen einen normalen Befund auf.

Aus den Ergebnissen der beschriebenen Versuche geht also deutlich hervor, daß das Vitamin B₁ eine schützende Wirkung gegenüber der Äthylalkoholvergiftung ausübt. Eine analoge Wirkung kommt der 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure zu.

Es scheint demnach wahrscheinlich, daß das Vitamin B₁ in den Stoffwechsel des Äthylalkohols eingreift.

Ob die 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure als solche oder erst nach einer im Organismus erfolgenden Synthese zum Vitamin B₁ den bei ihr nachgewiesenen Schutzeffekt ausübt, kann noch nicht entschieden werden. Diese Wirkung verdient jedoch schon jetzt Beachtung wegen der Möglichkeit, daß die 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure analog dem Vitamin B₁ am Aufbau enzymatischer Systeme mitwirkt. Dies würde als ein weiteres Beispiel die Annahme bestätigen, daß die Vitamine ihre Wirkung durch Förderung enzymatischer Prozesse ausüben.

Zusammenfassung.

An Ratten wurde die Wirkung der 2-Amino-5-methylthiazol-4-carbonsäure bei Äthylalkoholvergiftung untersucht. Sie übt — analog dem Vitamin B₁ — eine schützende Wirkung sowohl hinsichtlich des klinischen Bildes, wie der anatomischen und histologischen Veränderungen gegenüber der Alkoholvergiftung aus.

Literatur.

ABDERHALDEN, E.: zit. v. RONDONI, P.: *Biochimica*, U. T. E. T., Torino, 1942, S. 581. — ARNOLD, A., and C. A. ELVEHJEM: *Amer. J. Physiol.* **126**, 289 (1939). — BANGA, J., S. OCHOA et R. PETERS: zit. v. ASTRUC, A., u. J. GIROUX: *Les méd. d'orig. biol. Maloine*. Montpellier 1942, S. 58. — BATELLI, F., u. L. STERN: *Biochem. Z.* **28**, 145 (1910). — BRADDON, L., u. E. A. COOPER: zit. v. PETERS, R.: *Dtsch. med. Wschr.* **1937**, 1144. — LE BRETON, E.: *Ann. Physiol. biol.* **12**, 169 (1936); **12**, 301 (1936); **12**, 805 (1936). — *Th. Doc. Sc. Paris* 1936. — CASIER, H., F. THOMAS et A. L. DELAUNOIS: *Arch. internat. Pharmacodynamie* **69**, 186 (1943). — COWGILL, G. R.: zit. v. RONDONI, P.: *Biochimica*, U. T. E. T., Torino 1942, S. 583. — DEWAN, J. G.: *Brit. Med. J.* **112** (1943). — GREIG, M. E., u. W. M. M. GOVIER: *J. of Pharmacol.* **79**, 169 (1943). — HALD, J., u. E. JACOBSEN: *Acta Pharmacol.* **4**, 305 (1948). — *Lancet* II, 1001 (1948). — VAN HAMME, D.: zit. v. ASTRUC, A., u. J. GIROUX: *Les méd. d'orig. biol. Maloine*. Montpellier 1942, S. 58. — HESS, A. E.: *Z. physiol. Chem.* **1921**,

287. KÜHNAU, J., u. M. SCHERING: *Klin. Wschr.* **1940**, Nr. 28. — LECOQ, R.: *Déséquilibre. aliment. nutrit. et hum.* 2^e éd. Paris 1939. — LIPMANN, O.: zit. v. RONDONI, P.: *Biochimica*, U. T. E. T., Torino 1942, S. 580. — LOHMANN, K., u. PH. SCHUSTER (1): zit. von ASTRUC, A., et J. GIROUX: *Les méd. d'orig. biol.* Maloine. Montpellier 1942, S. 58. — LOHMANN, K.: zit. von CARERE-COMES, O.: *Vitamine e bioregulatori.* Minerva Medica. Torino 1947, S. 144. — DI MAGGIO, G.: *Biochemic. J.* **47**, 562 (1950). *Mitteil. Intern. Kongreß f. Biochemie*, Cambridge, 18 -25. Aug. 1949. — XVIII. *Intern. Physiol. Kongreß*. Kopenhagen, 15. -18. August 1950. — DI MATTEI, P.: *Att. Tema Vitamin.*, Ist. Ed. Cisalpino. Milano 1943. — MÖLLER, K. O.: *Pharmakologie*, S. 462. Basel: Benno Schwabe 1947. — OCHOA, S.: *Biochemic. J.* **33**, 1262 (1939). — PETERS, R.: *Dtsch. med. Wschr.* **1937**, 1144. — RAMOINO, N.: zit. v. RONDONI, P.: *Biochimica*, U. T. E. T., Torino 1942, S. 581. — RANDOIN, L., u. Mitarb.: zit. von PETERS, R.: *Dtsch. med. Wschr.* **1937**, 1144.

Dr. GAETANO DI MAGGIO, Istituto di Farmacologia, Catania/Italien, Via Androne 25.

Aus dem Physiologischen Institut der Friedrich Schiller-Universität Jena
(Direktor: Prof. Dr. FRIEDRICH SCHWARZ).

Über die optisch-motorische Reflexerregbarkeit des mit γ -Hexachlorcyclohexan vergifteten Frosches.

Von

ERNST VOLKMER und HORST WINTZER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Dezember 1953.)

Die zentral erregende Wirkung des γ -Isomeren des Hexachlorcyclohexans (γ HCC) auf Wirbeltiere ist bekannt. Mit γ HCC vergiftete Frösche werden besonders gegen Licht empfindlich, sie reagieren auf Lichtreize mit Zuckungen oder Krampfanfällen (SCHWARZ 1950, 1952, 1953). Durch das γ HCC werden offenbar optisch-motorische Reflexabläufe aufgedeckt, und es besteht die Aussicht, daß die Messung der *Reflexzeit* neue Befunde zum Verständnis der γ HCC-Wirkung zutage fördert. Deshalb wird in der vorliegenden Mitteilung über die Messung der Reflexzeit berichtet. Es werden die Reflexzeiten nach Einschalten und nach Ausschalten des Lichtes und bei verschieden starkem Licht gemessen und miteinander verglichen.

SCHWARZ (1953) hat über die Reaktion der vergifteten Frösche auf *rhythmische* Lichtstöße und Lichtlücken berichtet. Dabei hatten sich einige Fragen ergeben, die zu weiteren Versuchen Anlaß gaben. Hierüber wird ebenfalls in der vorliegenden Mitteilung berichtet.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten *Rana temporaria* und *esculenta*, deren Gewicht zwischen 20 und 40 g lag. Die Versuche wurden im Winter 1952 und im ganzen Jahr 1953 durchgeführt. Es wurde in heißem Alkohol gelöstes reines γ HCC, welches unter Zusatz von Adhaegon als indifferentem Emulgator mit RINGER-Lösung verdünnt war, injiziert (vgl. HOFFMANN und LENDLE 1948, SCHWARZ 1952). Nach der Injektion wurden die Frösche im Dunkeln aufbewahrt.

Messung der Reflexzeit. Es wurde helles und weniger helles Licht verwendet; die Helligkeiten verhielten sich zueinander wie 100 zu 3. Wenn die Reflexzeit auf das Wegnehmen des Lichtes gemessen wurde, mußte die Wirkung des Einschaltreizes vermieden werden, und zwar durch Einschleichen mit langsam an Helligkeit zunehmendem Licht: ein vor die Lichtquelle gehaltenes Verdunkelungspapier, das am Rande einen unscharf begrenzten Halbschatten warf, wurde in der Zeit von 2 sec fortgezogen.

Um die Bewegungen des Versuchstieres zu registrieren, wurde ihm ein Fühlhebel auf den Kopf gesetzt, der an dem einen Hebelarm eines Schreibhebels befestigt war.

Bei der geringsten Auf- oder Abwärtsbewegung des Kopfes wurde ein Schalter geschlossen. An jedem Arm des Schreibhebels war ein solcher Schalter angebracht. Er bestand aus einer Quecksilberperle, die als träge Masse in einem Glasnöpfchen an einer sehr dünnen, weichen Wendelfeder hing, und einem dünnen, zugespitzten Draht. Bei der geringsten Abwärtsbewegung eines Hebelarms bekam die Spitze des Drahtes Kontakt mit dem Quecksilber und schloß einen Registrierstromkreis, der einen Markiermagneten betätigte. Der Markiermagnet schrieb auf einem Rußkymographion.

Beim Ein- und Ausschalten des Lichtes wurde ein anderer Markiermagnet betätigt, der ebenfalls auf der umlaufenden Trommel des Kymographions schrieb. Aus dem Abstand der beiden Marken wurde die Reflexzeit berechnet. Zur Null Eichung wurde der Fühlhebel auf den Markiermagneten im Lichtstromkreis gesetzt; dadurch wurde der Markiermagnet des Registrierstromkreises praktisch gleichzeitig mit dem Ein- und Ausschalten des Lichtes betätigt.

Der Frosch wurde auf einem Brettchen mit Drahtbügeln so befestigt, daß er alle Glieder ausstrecken und sich aufrichten konnte. Das Versuchstier konnte während

Tabelle 1. Reflexzeiten bei Fröschen auf Lichtreize, 30—96 Std nach der Injektion von 4 mg γ HCC.

Lichtreiz	n_1	Einschalten $M_1 \pm m_1$ (Millisekunden)	n_2	Ausschalten $M_2 \pm m_2$ (Millisekunden)	$D - m_D$ (Millisekunden)	t	W %
hell.	91	$133,3 \pm 1,6$	47	$105,0 \pm 2,3$	$28,3 \pm 2,8$	10,1	99
schwach. . . .	129	$158,0 \pm 1,4$	48	$117,0 \pm 2,3$	$41,0 \pm 2,7$	15,2	99
$D' \pm m_D'$. . . (Millisekunden)		$24,7 \pm 2,1$		$12,0 \pm 3,2$			
t'		11,8		3,8			
$W'\%$		99		99			

n = Anzahl der Einzelmessungen. M = arithmetisches Mittel der n einzelnen Reflexzeiten. m = mittlerer Fehler (mittlere Abweichung) von M . D = Differenz zwischen M_1 und M_2 . m_D = mittlerer Fehler der Differenz D . t = Differenz D zwischen M_1 und M_2 , dividiert durch den mittleren Fehler m_D der Differenz (students test). W gibt die Wahrscheinlichkeit in Prozent an, mit der zwischen M_1 und M_2 ein Unterschied besteht. Die für die Berechnung benutzten Formeln wurden der Monographie von W. U. BEHRENS (1933) entnommen.

der Versuche im Dunkeln gelassen werden. Die Versuche wurden zwischen 30 und 96 Std nach der Injektion von 3—5 mg γ HCC durchgeführt.

Rhythmisch intermittierende Lichtreize. Die Versuche wurden mit weißem Licht und mit der gleichen Versuchsanordnung durchgeführt, wie sie SCHWARZ (1953) verwendet hat.

Die Raumbeleuchtung ergab am Boden des Glastroges eine Beleuchtungsstärke von 10 Lux. Die Beleuchtungsstärke der rhythmischen Lichtreize betrug am Boden des Glastroges 66 Lux, die zur Grundbeleuchtung von 10 Lux hinzukamen.

Mittels zweier Graukeile, die auf die rechteckigen Ausschnitte der rotierenden Kreisscheibe aufgesetzt werden konnten, wurde ein allmähliches Zu- oder Abnehmen des auf das Tier fallenden Lichtes erreicht. Die Graukeile waren photographisch aus

Diapositivfilm hergestellt worden. Die Versuchsanordnung wurde für Untersuchungen benutzt, bei denen die Wirkung entweder nur der Lichtstöße oder nur der Lichtlücken untersucht werden sollte (vgl. Abb. 1).

Versuche und Ergebnisse.

Messung der Reflexzeit. Die Reflexzeiten wurden in genügend großen zeitlichen Abständen gemessen, um eine Beeinflussung des Reflexablaufes durch den vorhergehenden Reflex zu vermeiden. Die Reflexzeiten, die auf den Ausschalt-Lichtreiz folgten, wurden nach Einschleichen des Lichtes und nach ausreichend langer Belichtung (20—30 sec) gemessen.

In Tab. 1 sind die Befunde dargestellt worden. Ein Vergleich der Werte „ M_1 “ und „ M_2 “ zeigt, daß die Reflexzeiten nach dem Einschalten des Lichtes länger als nach dem Ausschalten sind. Auch bei Fröschen, deren Reizschwelle für das Einschalten niedriger als für das Wegnehmen des Lichtes war, war die Reflexzeit beim Einschalten des Lichtes länger als beim Ausschalten. Zwischen den Reflexzeiten nach Einschalten und nach Ausschalten des Lichtes ergaben sich Differenzen von 28—41 msec (Werte „ D “ in der Tabelle 1). Diese Differenzen sind statistisch gesichert.

In den 3 unteren Zeilen der Tabelle werden die bei verschiedenen starkem Licht gefundenen Reflexzeiten miteinander verglichen. Aus den Daten geht hervor, daß zum stärkeren Lichtreiz die kürzere Reflexzeit gehört und daß der Unterschied statistisch gesichert ist.

Versuche mit intermittierenden Lichtreizen. Die Versuche beschäftigten sich zunächst mit der „Ein- und Ausschleichwirkung“ bei rhythmischer Darbietung der Lichtreize. In Abb. 1 sind diese Versuche dargestellt worden. In den 4 Versuchsreihen A, B, C und D wurden insgesamt 105 Versuchstiere, die auf das Ausschalten des Lichtes stärker als auf das Einschalten reagierten, auf ihre Krampfbereitschaft untersucht. Die Versuche der Reihe A, bei denen der Lichtreiz eingeschlichen und plötzlich weggenommen wurde, ergaben von 33 Versuchstieren nur 7 krampfende Tiere. Die Versuche der Reihe B, bei denen das Licht plötzlich eingeschaltet und dann allmählich weggenommen wurde, ließen bei nur 6 von 33 Versuchstieren Krämpfe beobachten. Die nicht krampfenden Tiere reagierten mit Zuckungen auf die plötzlichen Reize. Die Versuche der Reihen C und D dagegen führten bei zusammen 32 von 39 Versuchstieren zu Krämpfen.

Es ist wahrscheinlich, daß die Krampfbereitschaft der Tiere von der Jahreszeit abhängig ist. So ergaben z. B. die Versuche im Herbst 1952 und 1953 bei etwa 65% der untersuchten Tiere tonisch-klonische Krämpfe, während die Versuche im Frühjahr 1953 nur bei etwa 15% der

Tiere Krämpfe beobachten ließen. Die Krampfbereitschaft hängt ferner vom Grad der Vergiftung ab. Von den Tieren, denen nur 3 mg γ HCC injiziert worden waren, bekamen nur wenige (etwa 10% der im Herbst untersuchten Frösche) Krämpfe; auch brachen die Krämpfe nach einer

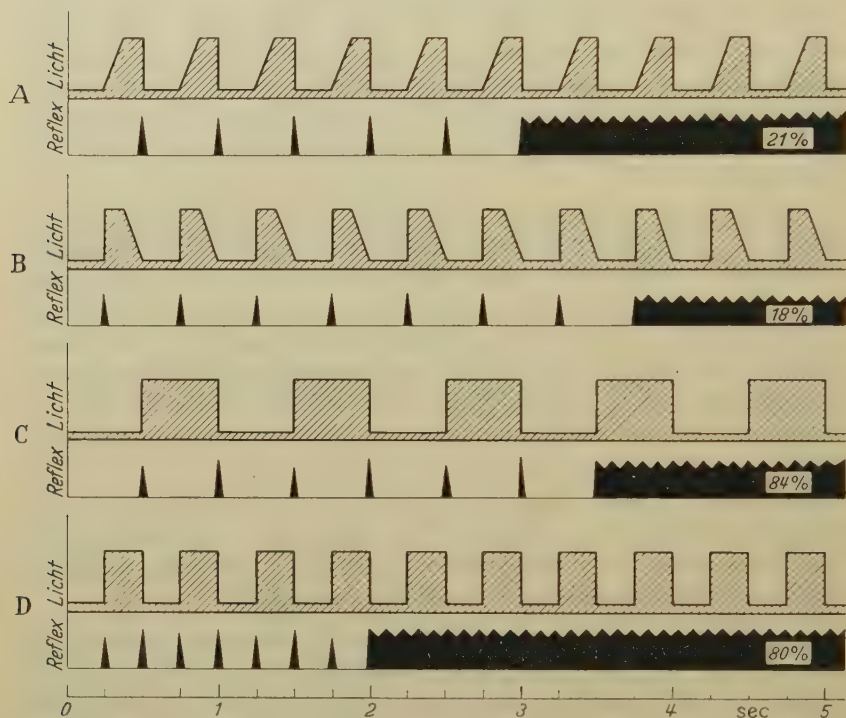


Abb. 1. Reaktionen der mit γ -HCC vergifteten Frösche auf rhythmisch intermittierende Lichtreize verschiedener Frequenz und verschiedener Form (Einschleichen und Ausschleichen). Abszissen: Zeit in Sekunden. Ordinaten, Licht: Dauerlicht von 10 Lux, auf das sich Lichtblitze von 66 Lux aufsetzen. Reflex: Die Höhe der spitzen Dreiecke deutet das Ausmaß der Zuckungen an. Sägezackkurven: Krampf; darin Angabe der in dieser Versuchsreihe von Krämpfen befallenen Frösche in Prozent der untersuchten Frösche.

etwa 3 mal längeren Serie rhythmischer Reize aus als bei den Tieren, die mit 5 mg vergiftet worden waren.

Bei einigen Fröschen ergab sich folgender Befund: Auf eine Frequenz von 4 Reizen in 1 sec reagierten die Tiere mit Zuckungen, deren Intensität allmählich abnahm. Sofort nach dem Erlöschen der Zuckungen wurde mit halber Frequenz, also 2 Reizen in 1 sec, weitergereizt. Die Zuckungen setzten jetzt wieder ein, erfolgten regelmäßig, die Reaktionen auf das Wegnehmen des Lichtes wurden sogar heftiger, bis schließlich Krämpfe eintraten.

Theorie.

Es ist auffällig, daß die Reflexzeiten nach dem Einschalten des Lichtes länger als nach dem Ausschalten des Lichtes sind. Es wurden Differenzen von 40 msec bei schwachem und 30 msec bei starkem Lichtreiz festgestellt. Bekanntlich unterscheidet man beim Elektoretinogramm (ERG) verschiedene Potentialschwankungen (vgl. GRANIT 1947). Der on-effect besteht aus einer negativen a-Welle und einer positiven b-Welle, der off-effect aus einer positiven d-Welle. In letzter Zeit hat MÜLLER (1953) das ERG vom Frosch aufgezeichnet und gefunden, daß die b-Welle 105 msec nach dem Einschalten, die d-Welle 60 msec nach dem Ausschalten des Lichtes ihren Gipfel hat. Die Latenzzeiten der elektrischen Schwankungen in der Retina nach dem Ein- oder Ausschalten des Lichtes unterscheiden sich also um 45 msec, und die Latenzzeit nach dem Einschalten des Lichtes ist länger als die nach dem Ausschalten. Diese Befunde stimmen gut mit unseren Ergebnissen überein. Man könnte zu dem Schluß kommen, daß die Zuckung auf das Einschalten des Lichtes durch die b-Welle, die Zuckung auf das Ausschalten durch die d-Welle des ERG ausgelöst wird.

Die Befunde bei rhythmischer Reizung, wobei entweder ein- oder ausgeschlichen wird, können wir noch nicht deuten. Der niedrige Prozentsatz der in Krampf verfallenden Frösche kann nicht an der niedrigen Frequenz der rechteckigen Lichtreize liegen, denn bei der gleichen Frequenz von nur rechteckigen Reizen verfallen wesentlich mehr Frösche in Krampf (vgl. die Kurven A, B und C der Abb. 1). Es sieht so aus, als ob der ein- oder ausschleichende Lichtreiz die Summationsfähigkeit beeinträchtigt. Da die Summation wohl an zentralnervösen Synapsen stattfindet und der Krampf hier seinen Ursprung hat, ist es offenbar nicht gleichgültig, ob die Reflexe nur von b- oder nur von d-Wellen oder abwechselnd von b- und d-Wellen des ERG ausgelöst werden.

Zusammenfassung.

Es wird über die Reflexzeiten von Fröschen nach Vergiftung mit γ -Hexachlorcyclohexan berichtet. Die Reflexzeiten liegen in einem Bereich von 100—160 msec. Je stärker der Reiz ist, desto kürzer ist die Reflexzeit. Die Reflexzeiten nach Einschalten des Lichtes sind gegenüber denen nach Wegnehmen des Lichtes um 30—40 msec länger. Da zwischen der Latenzzeit der b-Welle des on-effect und der d-Welle des off-effect des Elektoretinogramms ein Unterschied von 45 msec besteht, kann man zu dem Schluß kommen, daß die Reflexe durch die b- und d-Welle ausgelöst werden.

Bei der Reizung mit rhythmisch intermittierendem Licht verfallen viel weniger Frösche in Krampf, wenn der Lichtreiz eingeschlichen und plötzlich weggenommen oder plötzlich gesetzt und ausgeschlichen wird, als wenn das Einschalten und Wegnehmen des Lichtes plötzlich (rechteckig) erfolgt. Die Krampfbereitschaft der Frösche scheint im Herbst größer als im Frühjahr zu sein.

Literatur.

BEHRENS, W. U.: Mathematische Methoden für Versuchsansteller. Stuttgart: Eugen Ulmer 1933. — GRANIT, R.: Sensory mechanism of the retina. Oxford: Oxford University Press 1947. — HOFFMANN, I., u. L. LENDLE: Zur Wirkungsweise neuer insektizider Stoffe. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **205**, 223 (1948). — MÜLLER, H.: Das Elektroretinogramm des Frosches unter Einwirkung von Strychnin, Urethan und Santonin nach Belichtung mit energiegleichem Licht verschiedener Wellenlänge. Pflügers Arch. **254**, 155 (1953). — SCHWARZ, F.: Weitere Versuche über die Wirkung kontaktinsektizider Stoffe auf einige Kaltblüter. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **211**, 121 (1950). — Sinnesphysiologische Untersuchungen an Fröschen über die Wirkung des γ -Hexachlorcyclohexan. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **216**, 358 (1952). — Weitere sinnesphysiologische Untersuchungen über die Wirkung des γ -Hexachlorcyclohexan. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 194 (1953).

ERNST VOLKMER und HORST WINTZER,
 Physiologisches Institut der Universität Jena, Teichgraben 8.

Aus der I. Univ.-Frauenklinik Wien (Vorstand: Prof. Dr. T. ANTOINE).

Zur Verwendung des Fructosetests bei der Ratte unter besonderer Berücksichtigung seiner Eignung für den Nachweis schwacher androgener Effekte.

Von

H. RAUSCHER und W. SCHNEIDER.

(Eingegangen am 30. Dezember 1953.)

I.

Der im Samenplasma des Menschen und einer Reihe von Tierarten enthaltene Zucker, dessen Existenz schon ziemlich lange bekannt ist, wurde ursprünglich allgemein für Glucose gehalten. MANN⁹ hat 1945 entdeckt, daß es sich um *Fructose* handelt. Die Identifizierung^{8, 11, 12} wurde erstens durch die Darstellung von Methylphenylfructosazon ermöglicht, das zu den wenigen Substanzen gehört, durch die Fructose einwandfrei von Glucose unterschieden werden kann. Zweitens gelang es, den Zucker des Samenplasmas soweit zu reinigen, daß er dieselbe spezifisch-optische Aktivität aufwies wie reine kristallinische Fructose. Drittens wurde gefunden, daß die hefevergärbaren Kohlenhydrate im Samenplasma, die eine positive SELIWANOFF-Reaktion ergeben, zur Gänze mit Fructose identisch sind. Viertens hat sich unter Verwendung eines hochspezifischen Ferments, der Glucoxydase, ergeben, daß im normalen Samenplasma Glucose entweder überhaupt nicht oder nur in Spuren vorkommt, die vollkommen vernachlässigt werden können.

In der Folge wurde von MANN und PARSONS¹³ erstmalig gezeigt, daß beim Kaninchen die Fructose nach der Kastration aus dem Samenplasma verschwindet und nach Zufuhr von männlichem Hormon prompt wieder erscheint. Bei der kastrierten Ratte fanden dieselben Autoren eine *direkte* quantitative Beziehung zwischen den verabreichten Hormonmengen und der Höhe des Fructosegehalts in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Auf Grund dieser Untersuchungen ergab sich, daß sich die Tätigkeit des Hodenhormons in der Fructosebildung der männlichen Anhangsorgane außerordentlich getreu widerspiegelt. Diese Feststellung wurde zur Grundlage für die Entwicklung eines Verfahrens, das von MANN und PARSONS als *Fructose-Test* bezeichnet und später (MANN, DAVIES und HUMPHREY¹⁵, LUTWAK-MANN, MANN und PRICE⁷) noch weiter ausgearbeitet wurde. Der Fructose-Test stellt nach MANN und PARSONS eine sehr empfindliche und dabei relativ einfach durchzuführende Methode

dar, die den Effekt von Stoffen mit androkinetischer Wirkung nicht nur *qualitativ*, sondern auch *quantitativ* zu erfassen erlaubt. Um experimentell eine von außen zugeführte Substanz auf ihre androgene Wirkung am kastrierten Tier zu prüfen, kann die Verabreichung entweder prophylaktisch (*Erhaltungstest*) oder kurativ (*Regenerationstest*) erfolgen.

In dem uns zugänglichen deutschsprachigen Schrifttum wurde auf den Fructosetest bisher anscheinend noch nicht näher eingegangen. Deshalb sollen im nachfolgenden einige Bemerkungen vorausgeschickt werden, bevor über die eigenen Untersuchungen berichtet wird.

Die Fructose wird regelmäßig als Bestandteil des Samenplasmas beim Menschen und ferner unter anderem bei Hengst, Eber, Stier und bei den kleinen Nagern gefunden. Ihre Konzentration im Samenplasma ist nach Species verschieden. Auch der Produktionsort¹⁰ variiert je nach der Art. Beim Menschen haben HUGGINS und JOHNSON⁶ bereits 1933 festgestellt, daß der — von ihnen noch nicht als Fructose erkannte — reduzierende Zucker aus den Samenblasen stammt. Einige Tierarten, wie das Kaninchen, vermögen zusätzlich auch in der Prostata³ Fructose zu bilden. Bei der Ratte wird nach HUMPHREY und MANN⁶ die Fructose hauptsächlich in der sogenannten coagulating gland und in der dorsolateralen Prostata gefunden, während ventraler Anteil und Bläschendrüsen fructosefrei sind.

Die Spermien aus Testis und Epididymis enthalten noch keine Fructose. In das Ejakulat gelangt sie erst mit dem Samenplasma, das von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen abgesondert wird, und deshalb besteht im allgemeinen auch keine direkte quantitative Beziehung zwischen Spermienkonzentration und Fructosegehalt; nicht selten ist das Verhältnis sogar invers, insofern als bei hohem Spermiengehalt des Ejakulats wenig Fructose gefunden wird und umgekehrt.

Die Frage nach dem *Entstehungsmechanismus* der Fructose in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist zur Zeit noch nicht vollkommen geklärt. Außer Zweifel steht lediglich, daß für die Auslösung der Stoffwechselvorgänge, die physiologischerweise zur Entstehung der Fructose führen, das männliche Hormon direkt oder indirekt eine maßgebliche Rolle spielt. Die bisherigen Untersuchungen machen sehr wahrscheinlich, daß als Ausgangsmaterial für die Fructosebildung die Glucose des Blutes anzusehen ist. In den Rahmen dieser Auffassung fügt sich gut ein, daß MANN und PARSONS in neueren Untersuchungen bei Diabetikern¹⁴ Fructosewerte ermittelt haben, die deutlich über der Durchschnittsnorm lagen. Die gleichen Autoren haben ferner bei Kaninchen mit Alloxandibetes die Beobachtung machen können, daß der Anstieg des Blutzuckers auf das fünffache eine annähernd identische Zunahme des Samenzuckers nach sich zog; analog dazu folgte dem Abfall der Glucose nach Insulin auch ein Rückgang der Samenfructose, die erst nach Erlöschen der Insulinwirkung wieder zum Ausgangswert anstieg.

Die Durchführung des Fructosetests ist technisch auf 2 Arten möglich. Die eine von ihnen besteht in der Bestimmung der Fructose in der *Samenflüssigkeit*, bei der anderen wird der Fructosegehalt der *akzessorischen Geschlechtsdrüsen* ermittelt.

Unter Verwendung der zweitgenannten Methodik konnte unter anderem bei einer Reihe von Tierarten gezeigt werden (DAVIES und MANN³), daß sich die endokrine Hodenfunktion an der Fähigkeit zur Fructosebildung schon lange vor dem Zeitpunkt manifestiert, zu dem die Spermiogenese einsetzt. Diese Beobachtungen stellen in gewisser Hinsicht ein Analogon zu den viel älteren Befunden von NELSON

und MERCKEL¹⁷ dar, die bereits 1937 erhoben wurden. Nach ihnen liegt beim hypophysektomierten Tier die Testosterondosis, die die Entwicklung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen anzuregen vermag weit unter jener, die für die Erhaltung der Spermio-genese benötigt wird. Die Empfindlichkeit des Fructosetests konnte besonders eindringlich in Untersuchungen bei Stierkälbern¹⁵ vor Augen geführt werden. Den Tieren, die im Alter von 1—2 Wochen kastriert worden waren, wurde 7 Monate nach der Gonadektomie Testosteron in Tabletten zu je 500 mg pro Tier implantiert. Die in 4 Wochen resorbierte Menge betrug, wie durch Rückwägung festgestellt wurde, pro Tier durchschnittlich 160 mg. Nach dieser Dosis war in den Samenblasen bereits ein hoher Fructosegehalt festzustellen; bei der gleichzeitig vorgenommenen histologischen Untersuchung ergab sich hingegen, daß am Epithel noch keinerlei Anzeichen für eine funktionelle Regeneration zu erkennen waren.

Dieses Ergebnis läßt entnehmen, daß die Schwelldosis für die Fructosebildung sogar beträchtlich unter jener für die Auslösung faßbarer Epithelveränderungen liegen kann. Gleichzeitig legt es nahe, für Untersuchungen über androgene Effekte, bei denen sich die Verwendung eines besonders empfindlichen Nachweisverfahrens empfiehlt, den Fructosetest heranzuziehen.

II.

Die eigenen Untersuchungen hatten zum Ziel, die Verwendungsfähigkeit des Fructosetests für den Nachweis *schwacher* androgener Effekte zu prüfen. Als Versuchstier wurde die Ratte gewählt. Im Zuge orientierender Vorversuche sind wir auf ein Problem gestoßen, über das noch keine genügende Klarheit bestand. Es betrifft ganz allgemein die Frage, welche Voraussetzungen in bezug auf das zu verwendende Tiermaterial zu beachten sind, um bei der Interpretation von Befunden, bei denen nur *geringste* Fructosemengen nachgewiesen werden, möglichst sicher zu gehen. Die Untersuchungen, die auf die Klärung dieser Frage gerichtet waren, gaben Anlaß zur vorliegenden Mitteilung.

Bei der Ratte erfolgt die Fructosebestimmung an der Prostata. Deshalb ist einer *direkten* Ermittlung jeweils nur das Endresultat eines Versuchs zugänglich; die Ausgangswerte können auf Grund des Verhaltens bei den Kontrolltieren lediglich erschlossen werden. Eine verlässliche Beurteilung der Endergebnisse bedarf als Voraussetzung der Gewähr, daß die Ausgangswerte bei Versuchstieren und Kontrollen identisch waren. Der Fructosegehalt der Prostata des erwachsenen Tieres schwankt bei der Ratte nach eigenen Ermittlungen innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Am Tage der Kastration wurden auch zwischen gleich alten Tieren erhebliche Unterschiede gefunden. Im Hinblick auf diese Schwankungen der Ausgangswerte sehen wir für den Nachweis *geringer* androgener Effekte die Kontrolle des Fructosegehalts im *Erhaltungstest* als zumindest unzweckmäßig an.

Die Tiere, die zum *Regenerationstest* herangezogen werden, können entweder *vor* oder *nach* dem Zeitpunkt kastriert werden, zu dem die

spontane Fructosebildung einsetzt. Ihr Beginn dürfte zeitlich nach Tierstamm und Zuchtbedingungen etwas variieren. Bei insgesamt 85 Ratten des von uns aufgezogenen Inzuchtstamms (Albinoratten), die ständig unter den gleichen äußeren Bedingungen standen und als Kontrollen in experimentellen Untersuchungen verwendet wurden, haben wir bis zum 28. Lebenstag und sofern das Gewicht nicht 35 g überstieg, niemals Fructose feststellen können. Wir haben ferner die Prostata von je 20 Ratten, die am 28. Tag kastriert wurden, 12, 28 und 56 Tage nach der Kastration untersucht. Eine detaillierte Angabe über die Ergebnisse erübrigt sich, da bei der chemischen Analyse — nach der weiter unten beschriebenen Methodik — die Prostata aller dieser Tiere ausnahmslos fructosefrei gefunden wurde.

III.

Bei Ratten, die *nach* Einsetzen der Fructosebildung gonadektomiert wurden, hat man das Verhalten der Fructose nach der Kastration — soweit wir uns orientieren konnten — bisher noch nicht systematisch untersucht. Deshalb bestand auch eine gewisse Unsicherheit bezüglich der Frage, wann, bzw. unter welchen Voraussetzungen Fructosewerte, die im Regenerationstest bei *solchen* Tieren ermittelt werden, als sicher *exogen* bedingt angesehen werden dürfen. Von besonderer Bedeutung war dabei naturgemäß die Ermittlung des Zeitpunkts, zu dem die *endogene* Fructose aus der Prostata verschwindet. Wir haben uns mit dieser Frage vor allem deshalb eingehend befaßt, weil ihre Beantwortung für die Interpretation experimenteller Befunde, in denen nur *minimale* Fructosewerte nachgewiesen werden, grundsätzlich wichtig erschien. In der Absicht, dieser Frage nachzugehen, haben uns außerdem auch Befunde bestärkt, die wir vorher bei Meerschweinchen erhoben haben. Bei diesem Tier konnten wir noch 3 Monate nach der Kastration erhebliche Fructosewerte ermitteln. Morphologie und histologisches Bild der gleichzeitig untersuchten Nebennieren legten die Vermutung nahe, daß beim Meerschweinchen die Anwesenheit verhältnismäßig beträchtlicher Fructosemengen so lange nach der Kastration mit diesem Organ im Zusammenhang stehen könnte. Für die männliche Maus hat BOTELLA LLUSIA¹ gezeigt, daß — unter der Einwirkung von Choriogonadotropin — die Nebennierenrinde nach der Kastration sogar zu beachtlichen androkinetischen Leistungen befähigt ist. Für die Ratte lagen bisher keine sicheren Anhaltspunkte dafür vor, daß auch bei Tieren, die im geschlechtsreifen Alter kastriert wurden, die Nebenniere in der Folge die akzessorischen Drüsen zu stimulieren vermag. Nun stand aber mit der Fructosebestimmung ein neues — und im Hinblick auf die oben erwähnten Untersuchungen bei Stieren — anscheinend besonders empfindliches Indicatorverfahren zur Verfügung. Das ließ die Frage aufkommen, ob an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen ein

negativer histologischer Befund allein auch heute noch als ausreichend anzusehen ist, um die Existenz androgener Impulse zu negieren. Auch für die Verhältnisse nach der Kastration konnte deshalb nicht von vornherein ausgeschlossen werden, daß die Fructosebestimmung eventuell Zeichen einer androgenen Wirkung aufzudecken vermag, die sich dem Nachweis durch die histologische Untersuchung entzieht.

Für die Verwendung im Regenerationstest lief die Untersuchung über den Verlauf des Fructoseabfalls primär auf zwei Fragen hinaus. Erstens, verschwindet nach der Kastration geschlechtsreifer Ratten die Fructose überhaupt gänzlich aus der Prostata und — zutreffendenfalls — zweitens, wann ist mit einer möglichst jeden Zweifel ausschließenden Sicherheit der Zeitpunkt als erreicht anzusehen, von dem an die Prostata als fructosefrei gelten darf? Von der Beantwortung dieser zweiten Frage war gleichzeitig eine entsprechende Orientierung über die Frist zu erwarten, die verstreichen muß, bevor Tiere, die im geschlechtsreifen Alter kastriert werden, für die Verwendung im Regenerationstest als geeignet bezeichnet werden dürfen.

Die Untersuchungen, die im Interesse der beiden bisher genannten Fragen in Angriff genommen wurden, boten Gelegenheit, auch noch einer dritten nachzugehen. Zur Untersuchung androgener Effekte an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurde vor Bekanntgabe des Fructosotests die Wirkung vorwiegend am histologischen Bild der Samenblasen geprüft. Es wurde oben darauf hingewiesen, daß nach der *Zufuhr* androgener Stoffe die Wirkung auf die Fructosebildung mit jener auf das Epithel durchaus nicht parallel zu verlaufen braucht. Wir wollten nun prüfen, welches Verhalten sich nach dem *Wegfall* der Hodenhormonwirkung bezüglich der beiden verschiedenen Rezeptoren ergibt. Da zur Fructosebestimmung die gesamte Prostata aufgearbeitet wurde, konnte die histologische Untersuchung nur an den Samenblasen erfolgen. Bei den Beziehungen zwischen Verlauf des Fructoseabfalls und Verhalten der Rückbildungsvorgänge am Epithel wurde die Frage in den Vordergrund gestellt, ob und wie weit der Eintritt der histologisch erfaßbaren Kastrationsatrophie an der Samenblase einen Schluß auf das Verschwinden der Fructose aus der Prostata zuläßt.

Untersuchung und Ergebnisse.

Zur Untersuchung wurden insgesamt 110 männliche geschlechtsreife Ratten verwendet, die in Gruppen zu je 10 Tieren aufgeteilt waren. Das Tiergewicht betrug bei der Kastration zwischen 175 und 225 g. Die Kastration fand im Frühjahr statt und wurde innerhalb eines Zeitraumes von 8 Tagen durchgeführt. Am Tag der Kastration sowie 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70, 80, 100 und 120 Tage nachher wurden je 10 Tiere untersucht.

A. Chemische Untersuchung.

Zur Fructosebestimmung (MANN) wurde nach der Tötung der Tiere, die mittels Äther erfolgte, die Prostata sorgfältig herauspräpariert und vom eingelagerten Fettgewebe befreit. Die Wägung erfolgte in frischem Zustand auf der Torsionswaage, und

anschließend wurde das Organ nach Zusatz von Aqua dest. homogenisiert. Dazu wurden starkwandige Eprovetten aus Jenaer Glas mit eingeschliffenem Pistill verwendet, das bei der Rotation eine gleichmäßige Zerreibung gewährleistet. Zur nun folgenden Eiweißfällung haben wir zum Unterschied von MANN Zinksulfat und Natronlauge zugesetzt, worauf nach Einbringen in das kochende Wasserbad abgekühlt und filtriert wurde. Das Filtrat wurde mit 0,1% Resoreinol (gelöst in 90% Alkohol) und 30% HCl versetzt, hierauf 10 min ins Wasserbad von 80° C gestellt und anschließend rasch abgekühlt. Die Proben wurden in der üblichen Weise elektrophotometrisch ausgewertet. Die Umrechnung der Durchlässigkeitswerte erfolgte an Hand einer mit „Merck-Laeulose reinst“ hergestellten Eichkurve.

Dem Beispiel von MANN folgend wurden die Fructosewerte in der tabellarischen Zusammenstellung sowohl in γ /Organ wie in mg% angegeben. Bei der Beurteilung der mg%-Werte ist zu berücksichtigen, daß wir zur Bestimmung nicht nur jene Lappen, die die Fructose enthalten, sondern das Organ in toto verarbeitet haben.

B. Histologische Untersuchung.

Die Samenblasen wurden anschließend an die Entnahme in frischem Zustand gewogen und hierauf in Formol fixiert. Nach der üblichen Verarbeitung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histologisch untersucht.

Als Grundlage für die Beurteilung des Funktionsgrades im histologischen Bild dienten die von MOORE, HUGHES und GALLAGHER¹⁶ angegebenen Kriterien. Die voll ausgeprägten Kastrationsveränderungen sind durch das Fehlen von Sekretgranula und Mitosen, niedriges Epithel sowie Degenerationsvorgänge am Kern charakterisiert.

Nach eigenen Untersuchungen kann der Verlauf, den die Entwicklung der Kastrationsveränderungen nimmt, entsprechend der Jahreszeit, in der die Kastration erfolgt, variieren. In den vorliegenden Untersuchungen war der Einfluß der Jahreszeit bei allen Tieren als gleich anzusehen, da die Kastration des gesamten Tiermaterials innerhalb einer Woche stattfand.

In der Tab. I sind die Werte für Gewicht von Prostata und Samenblase sowie für die Fructose in γ /Organ und mg% angeführt. Die pro Gruppe aufscheinenden Zahlen stammen jeweils von jenen beiden Tieren, bei denen der höchste und niedrigste Fructosegehalt gefunden wurde. Aus diesen Werten ergibt sich ein Bild von den Schwankungen, die individuell bei den einzelnen Gruppen zu beobachten waren.

An Hand der angeführten Zahlen wird ersichtlich, daß der Fructoseabfall nach der Kastration nicht gleichmäßig verläuft. In einer ersten, relativ kurzen Phase, die bereits nach — spätestens — 14 Tagen beendet ist, fällt der Fructosegehalt steil ab. In der darauffolgenden zweiten Phase, die weitaus länger ist und in den vorliegenden Untersuchungen bis zu 80 Tagen gedauert hat, erfolgt der weitere Abfall nur mehr zögernd. 80 Tage nach der Kastration ist erstmals die Fructose bei jedem Tier der betreffenden Gruppe auf Null abgesunken. Derselbe Befund wurde 100 und 120 Tage nach der Kastration erhoben.

Die histologische Untersuchung der Samenblasen ließ innerhalb jeder Gruppe individuelle Unterschiede erkennen. In bezug auf die entscheidenden Kriterien waren aber die Bilder pro Gruppe doch sehr einheitlich.

Die am Tage der Kastration entnommenen Samenblasen zeigten histologisch ein Bild, das in allen Belangen den Kriterien von MOORE und Mitarbeitern für die vollfunktionierende Drüse entspricht. Die Zellen waren hochzylindrisch, ihr lumenwärts gelegener Saum häufig unscharf.

Tabelle 1. Abfall des Fructosegehalts der Prostata nach der Kastration geschlechtsreifer Ratten.

Entfernung vom Zeitpunkt der Kastration in Tagen	Prostata in mg	Samenblase in mg	Fructose γ/Organ	Fructose mg/%
0	431,0	1020,0	230,0	53,0
	220,0	522,0	131,0	59,0
14	112,0	103,0	11,0	10,0
	76,0	116,0	6,5	8,5
21	152,0	101,0	6,5	4,3
	200,0	240,0	4,5	2,2
28	143,0	150,0	4,5	3,1
	99,0	79,0	0,0	0,0
35	54,0	85,0	7,0	13,0
	32,0	64,0	3,5	11,0
42	122,0	132,0	6,0	4,7
	57,0	66,0	4,5	8,0
56	120,0	110,0	5,0	4,2
	68,0	55,0	1,0	1,4
70	73,0	74,0	2,0	2,7
	65,0	76,0	0,0	0,0
80	73,0	79,0	0,0	0,0
	66,0	55,0	0,0	0,0
100	60,0	58,0	0,0	0,0
	48,0	50,0	0,0	0,0
120	62,0	76,0	0,0	0,0
	54,0	70,0	0,0	0,0

In jeder Zelle waren verschieden reichlich Sekretgranula vorhanden, beim Großteil der Drüsen waren Mitosen an den basalständigen Kernen zu erkennen. Im zentralen und in den seitlichen Hohlräumen sowie in den einzelnen Drüsenlumina lag reichlich eosinophil gefärbtes Sekret.

14 Tage nach der Kastration waren die Epithelzellen bereits niedrig, der durchwegs ovale Kern wies Schrumpfungsvorgänge auf. Zumeist wurde lumenwärts von ihm noch ein mehr oder minder breiter Protoplasmasaum gefunden. Das Protoplasma erschien nicht homogen, Sekretgranula konnten aber mit Sicherheit nicht mehr ausgemacht werden. In jeder Samenblase lagen Sekretreste vorwiegend in den großen Hohlräumen.

Nach 3 Wochen bestand der Unterschied gegenüber dem vorigen Bild darin, daß das Protoplasma der nunmehr zunehmend kubischen Zellen homogen war.

Nach 4 Wochen waren die Epithelzellen bei allen Tieren höchstens kubisch, so daß der runde dunkle Kern, dessen Chromatin deutlich verklumpt war, praktisch die ganze Zellhöhe ausfüllte. Damit war (bei *dieser* nach 4 Wochen untersuchten Gruppe) das für den Vollkastraten charakteristische Epithelbild sicher erreicht. Sekretreste wurden bei nahezu jedem Tier gefunden.

Die Samenblasen, die 35, 42, 56, 70 und 80 Tage nach der Kastration entnommen wurden, boten praktisch das gleiche Bild wie jene nach 4 Wochen. Bei fast jedem dieser Tiere waren noch geringste Sekretreste anzutreffen. Nach 100 und 120 Tagen wurden auch diese nur mehr vereinzelt gefunden, am Epithel waren gegenüber den vorhergehenden 5 Gruppen keine sicher verwertbaren Unterschiede zu erkennen.

Diskussion.

Nach fast allgemein angenommener Auffassung (PARKES¹⁸) tritt nach der Kastration geschlechtsreifer *männlicher* Ratten — im Gegensatz zu den Verhältnissen beim weiblichen Tier — eine Hypertrophie der Nebennieren auf. Sie ist durch eine Verbreiterung der Fasciculata und Reticularis mit Zellvergrößerung und Vacuolenbildung⁴ charakterisiert. Die histologischen und gewichtsmäßigen Untersuchungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen haben bisher keinen Anhaltspunkt dafür erbracht, daß von der hypertrophierten Nebennierenrinde Stoffe abgegeben werden, die die männlichen Anhangsorgane zu stimulieren vermögen. In den vorliegenden Untersuchungen fand ein Indicatorverfahren Anwendung, das bezüglich der Empfindlichkeit den beiden älteren Methoden anscheinend überlegen ist. Die Ergebnisse zeigen, daß die Nebennierenrinde nach der im geschlechtsreifen Alter erfolgten Kastration bei der Ratte — im Gegensatz beispielsweise zum Meerschweinchen — nicht imstande ist, den Fructosegehalt der Prostata in nennenswertem Ausmaß aufrechtzuerhalten. Die heutigen Untersuchungen reichen allerdings unserer Ansicht nach nicht aus, um die Beteiligung extragonadaler Ursachen mit Sicherheit auch für die Anwesenheit jener geringen Fructosemengen auszuschließen, die wir verhältnismäßig lange nach der Kastration gefunden haben. Die Art des Verlaufs, die beim Fructoseabfall beobachtet wurde, scheint uns aber eher gegen eine solche Möglichkeit zu sprechen. Wir würden deshalb für weitaus am wahrscheinlichsten halten, daß die Fructose, die wir noch 70 Tage nach der Gonadektomie festgestellt haben, den Rest jener Menge darstellt, die zum Zeitpunkt der Kastration vorhanden war. Ob der bemerkenswert langsame Verlauf des Fructoseabfalls

aber tatsächlich *nur* als ein Problem der Rückresorption aufzufassen ist, kann mit Sicherheit vorderhand nicht beantwortet werden.

Der Umfang der individuell möglichen Schwankungen ist beträchtlich. Denn Nullwerte wurden erstmals — bei einem Tier — bereits 4 Wochen nach der Kastration gefunden; der Zeitraum, der verstrich, bevor bei jedem Tier der betreffenden Gruppe die Prostata fructosefrei gefunden wurde, betrug hingegen fast das 3fache, nämlich 80 Tage. Bemerkenswert ist ferner, daß nach der 5., 6. und 8. Woche etwas höhere Werte gefunden wurden als nach der 4. Woche. MANN und PARSONS¹⁴ haben im Zuge experimenteller Untersuchungen bei Ratten, die im Alter von 11 Monaten kastriert worden waren, 7 Wochen nachher 4 γ Fructose gefunden. Einer Mitteilung von PRICE, MANN und LUTWAK-MANN²¹ ist zu entnehmen, daß bei Tieren, die im Alter von 8—10 Wochen kastriert wurden, 9 Wochen nach der Kastration 0,9 γ ermittelt wurden. In unseren Untersuchungen war die Prostata 80 Tage nach der Kastration erstmals bei allen Tieren fructosefrei. Wir würden es aber nicht für empfehlenswert halten, sich bezüglich der Wartezeit für die Verwendung im Regenerationstest mit maximal 80 Tagen zu begnügen. Denn im Hinblick auf die individuellen Schwankungen und ferner auf die erwähnten fremden, bzw. eigenen Befunde, bei denen 63 bzw. 70 Tage nach der Kastration noch immer Fructose gefunden wurde, kann nicht als ausgeschlossen bezeichnet werden, daß gelegentlich einmal auch nach 80 Tagen oder vielleicht sogar auch noch etwas später Fructose vorhanden ist. Eine Verlängerung der Wartezeit wird die Interpretation der erhobenen Befunde naturgemäß sicherer gestalten. In unseren Untersuchungen war die Prostata 80, 100 und 120 Tage nach der Kastration bei *allen* Tieren der betreffenden Gruppen fructosefrei. Es dürfte hinreichend gerechtfertigt erscheinen, die im geschlechtsreifen Alter kastrierte Ratte 120 Tage nach der Kastration als im allgemeinen geeignet für die Verwendung im Regenerationstest anzusehen.

Im Interesse einer möglichst sicheren Beweisführung scheint uns diese Schlußfolgerung aber unter gewissen Bedingungen einer Einschränkung zu bedürfen. Das ist dann der Fall, wenn es sich um Untersuchungen von Stoffen handelt, die nur *minimale* Fructosemengen hervorzurufen vermögen. In dieser Auffassung wurden wir durch Ergebnisse bestärkt, die kürzlich von PRICE, MANN und LUTWAK-MANN²¹ mitgeteilt wurden. In ihren Untersuchungen wurden unter anderem zwei Gruppen von Ratten, die im Alter von 10 Wochen kastriert worden waren, 9 Wochen nachher in den Versuch genommen. Eine Gruppe erhielt durch 3 Wochen täglich 25 γ Testosteron, die andere diente als Kontrolle. Bei der Autopsie, die im Alter zwischen 20 und 22 Wochen erfolgte, wurde in der Prostata der mit Testosteron behandelten Tiere ein Fructosegehalt von 2,5 γ , bei den unbehandelten Kastraten ein solcher von 0,9 γ ermittelt.

Auf Grund unserer in zahlreichen Voruntersuchungen gesammelten Erfahrungen halten wir es nicht für möglich, Unterschiede dieser Größenordnung bei Anwendung der vorhin beschriebenen Methodik als signifikant zu bezeichnen. Deshalb müssen wir auch als außerordentlich fraglich ansehen, ob Untersuchungsergebnisse dieser Art dazu berechtigen, den Beweis für eine *exogene* androkinetische Wirkung als erbracht anzusehen. Es erschien uns sehr wünschenswert, dem Entstehen solcher Zweifel, die sich auch in eigenen Untersuchungen sehr störend bemerkbar gemacht haben, nach Möglichkeit vorzubeugen. Einen Weg dazu haben wir darin gesehen, die im Regenerationstest ermittelte Fructose bei Tieren, die erst *nach* Einsetzen der Geschlechtsreife kastriert wurden, nur dann als *sicher* exogen bedingt aufzufassen, wenn sie einen gewissen Grenzwert übersteigt. In den vorliegenden Untersuchungen waren die Fructosewerte 3 Wochen nach der Kastration erstmals bei allen Tieren der betreffenden Gruppe unter 10γ abgesunken und blieben von da an bis zum 120. Tag bei insgesamt 80 Tieren ständig unterhalb dieser Grenze. Daraus darf gefolgert werden, daß *endogene* Fructosemengen *über* 10γ bei Tieren, die im geschlechtsreifen Alter kastriert wurden, von einem bestimmten Zeitpunkt an normalerweise offenbar nicht mehr vorkommen. Wir sehen daher 10γ als einen geeigneten Grenzwert an und möchten unseren Standpunkt folgendermaßen formulieren: im Regenerationstest sind Fructosewerte bei Tieren, die im geschlechtsreifen Alter kastriert und 4 Monate nachher in den Versuch genommen wurden, dann für die androgene Wirkung einer von außen zugeführten Substanz als beweisend anzusehen, wenn sie 10γ übersteigen. Gleichzeitig würden wir es im Interesse einer möglichst korrekten Interpretation experimenteller Befunde für angezeigt halten, die *exogene* Wirkung als nicht bewiesen anzusehen, wenn die Fructose im Regenerationstest *nur* bei im geschlechtsreifen Alter kastrierten Tieren nachgewiesen wurde und dabei unter 10γ bleibt.

Auf Grund eigener Untersuchungen müssen wir die Möglichkeit, daß die Prostata auf androgene Stimulationen mit der Bildung von Fructosemengen unter 10γ reagiert, an sich für gegeben halten. Ebensowenig soll negiert werden, daß bei entsprechender Methodik Mengen unter 10γ erfaßt werden können. Aus den obigen Ausführungen geht hervor, warum wir die Verwendung von Ratten, die erst nach Einsetzen der spontanen Fructosebildung kastriert wurden, für die Prüfung von Stoffen, die nur eine *minimale* androgene Wirkung entfalten, für unzuverlässig halten. Ihre Verwendung ist außerdem auch deshalb nicht zu empfehlen, weil bekanntlich bei Ratten, die erst nach Eintritt der Geschlechtsreife gonadektomiert werden, die Empfindlichkeit gegenüber androgenen Substanzen mit zunehmender Entfernung vom Zeitpunkt der Kastration abnimmt. Somit trat die Frage in den Vordergrund, inwieweit

für Untersuchungen über androgene Effekte, bei denen mit Fructosemengen in der Größenordnung unter 10 γ zu rechnen ist, Tiere geeignet sind, die *vor* Einsetzen der spontanen Fructosebildung kastriert werden.

Wir haben eingangs berichtet, daß bei den Tieren des von uns verwendeten Stammes die Prostata am 28. Lebenstag fructosefrei gefunden wurde. Bezüglich der Verwendung für den Regenerationstest war zu bedenken, daß die Nebennierenrinde der *infantilen* Ratte zur Produktion von Stoffen befähigt ist, die eine androkinetische Wirkung entfalten. Nach der Kastration sehr junger Tiere wird nämlich nicht nur keine Degeneration, sondern sogar eine Zunahme der männlichen Anhangsorgane beobachtet¹⁹. Nach BURILL und GREENE² gewinnt die androgene Funktion allerdings nur dann eine Bedeutung, wenn die Testes *fehlen*. PRICE²⁰ gelang dann die Feststellung, daß die *Dauer* der androgenen Funktion der infantilen Nebenniere zeitlich beschränkt ist. In Untersuchungen, bei denen Prostatagewebe infantilen kastrierten männlichen Ratten implantiert wurde, konnte sie zeigen, daß die von seiten der Nebenniere auf die Prostata gerichtete Stimulation erlischt, wenn das Wirtstier ein Alter von rund 40 Tagen erreicht.

Die Prostata unserer Ratten, die am 28. Tag kastriert wurden, war am 40. Tag ausnahmslos fructosefrei; derselbe Befund wurde am 56. und 84. Lebenstag erhoben. Daraus darf geschlossen werden, daß der Zeitraum von 12 Tagen — 28. bis 40. Lebenstag — zu kurz ist, um eine Manifestation androgener Effekte von seiten der Nebennierenrinde — jedenfalls soweit es die Fructosebildung anlangt — in Erscheinung treten zu lassen. Die Anwesenheit *endogener* Fructose bei Tieren, die am 28. Tag kastriert wurden, halten wir ab 84. Lebenstag für offenbar unmöglich. Es dürfte ferner kaum ein Zweifel bestehen, daß die Anwesenheit von Fructose bei Tieren, deren Prostata diesen Zucker noch nie gebildet hat, an sich als beweiskräftiger anzusehen ist, als bei solchen, die erst nach Einsetzen der spontanen Fructoseproduktion kastriert wurden. Unter Berücksichtigung aller vorstehenden Gründe glauben wir, daß Ratten, die im Alter von 28 Tagen kastriert und frühestens 8 Wochen nachher in den Versuch genommen wurden, auch für den Nachweis *minimaler* androgener Effekte als geeignet anzusehen sind. Bei solchen Tieren stellt der Nachweis der Fructose unseres Erachtens auch dann einen Beweis für eine *exogene* Wirkung dar, wenn die ermittelten Werte weniger als 10 γ betragen. Zum Ausschluß von Fehlerquellen würden wir für außerordentlich empfehlenswert halten, vor der Beschäftigung mit experimentellen Fragen bei dem für die Verwendung in Aussicht genommenen Rattenstamm den Zeitpunkt zu ermitteln, zu dem *frühestens* die Fructosebildung nachweisbar wird.

Bei der *histologischen* Untersuchung an den erwachsenen Tieren zeigte das Epithel aller Samenblasen, die 4 Wochen nach der Kastration ent-

nommen wurden, das für den Vollkastraten charakteristische Bild. Der Fructosegehalt der Prostata war hingegen erstmals erst 80 Tage nach der Kastration bei *allen* Tieren der betreffenden Gruppe auf Null abgesunken. Es wurde oben erwähnt, daß unter gewissen experimentellen Bedingungen der Effekt nach der Zufuhr von Androgenen an der Fructosebildung früher in Erscheinung tritt als am Epithel. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß nach dem *Ausfall* der Hodenhormonproduktion ein spiegelbildliches Verhalten besteht, insofern als hier zuerst das Epithel atrophisch wird und erst später die Fructose aus der Prostata verschwindet. Aus dem Vergleich zwischen chemischen und histologischen Befunden geht hervor, daß das Erscheinen voll ausgeprägter Kastrationsveränderungen an der Samenblase keinen Schluß auf das Verschwinden der Fructose aus der Prostata zuläßt. Für Untersuchungen, die sich mit dem Nachweis des Effektes exogener Substanzen befassen, ergibt sich hieraus eine wichtige Ableitung: die histologische Untersuchung gibt lediglich Aufschluß darüber, ob die Schwelldosis erreicht wurde, die zur Auslösung von Epithelveränderungen benötigt wird. Sie bietet aber keine Handhabe, den Effekt von Substanzen auszuschließen, deren androkinetische Wirkung lediglich durch den Fructosenachweis erfaßt werden kann.

Zusammenfassung.

Nach Vorbemerkungen über Voraussetzungen, Durchführungsarten und einige experimentelle Ergebnisse im Fructosetest wird über die eigenen Untersuchungen berichtet. Dabei wurden folgende Befunde erhoben:

1. Bei Ratten, die im Alter von 28 Tagen kastriert wurden, war die Prostata am Tage der Kastration sowie 12, 28 und 56 Tage nachher fructosefrei.
2. Bei Ratten, die im geschlechtsreifen Alter kastriert wurden, war die Fructose erstmalig 80 Tage später bei allen Tieren der betreffenden Gruppe nicht mehr nachzuweisen.
3. Das histologische Bild der Samenblasen, die 28 Tage nach der Kastration bei geschlechtsreifen Tieren entnommen wurden, zeigte in jedem Fall die Zeichen der voll ausgeprägten Kastrationsatrophie.

Für den Nachweis *schwacher* Androgenwirkungen im Fructosetest bei der Ratte ergaben sich folgende Richtlinien:

1. Die Untersuchung im Erhaltungstest ist wegen der Inkongruenz des Ausgangsmaterials als ungeeignet anzusehen.
2. Für die Verwendung im Regenerationstest sind Tiere, die erst nach Eintritt der Geschlechtsreife kastriert werden, nach einer Wartezeit von 4 Monaten im allgemeinen als geeignet zu bezeichnen. Ihre Verwendung ist aber unzweckmäßig, wenn es sich um Untersuchungen handelt, bei denen nur minimale androgene Effekte zu erwarten sind.

3. Beweisende Ergebnisse im Regenerationstest sind am sichersten bei der Verwendung von Tieren zu erreichen, die im Alter von 28 Tagen kastriert und frühestens 8 Wochen nachher in den Versuch genommen werden.

4. Das Fehlen von Funktionszeichen am histologischen Bild der Samenblase schließt nicht aus, daß geringe androgene Impulse bestehen, die im Fructosetest nachzuweisen sind.

Literatur.

- ¹ BOTELLA LLUSIA, J.: Trab. Inst. Nacional Med. (Madrid) **13**, 66 (1950). —
² BURILL, M. W., and R. R. GREENE: Endocrinology (Springfield, Ill.) **26**, 645 (1940). — ³ DAVIES, D. V., and T. MANN: Nature (Lond.) **160**, 295 (1947). — ⁴ HALL, K., and V. KORENCHESKY: J. of Physiol. **91**, 365 (1938). — ⁵ HUGGINS, C., and A. A. JOHNSON: Amer. J. Physiol. **103**, 574 (1933). — ⁶ HUMPHREY, G. F., and T. MANN: Nature (Lond.) **161**, 352 (1948). — ⁷ LUTWAK-MANN, C., T. MANN and D. PRICE: Proc. Roy. Soc. Med. **136**, 461 (1949). — ⁸ MANN, T.: Biochemic. J. **39**, 458 (1945). — ⁹ MANN, T.: Nature (Lond.) **156**, 80 (1945). — ¹⁰ MANN, T.: Biochemic. J. **40**, 20 (1946). — ¹¹ MANN, T.: Biochemic. J. **40**, 481 (1946). — ¹² MANN, T.: Nature (Lond.) **157**, 79 (1946). — ¹³ MANN, T., and U. PARSONS: Nature (Lond.) **160**, 294 (1947). — ¹⁴ MANN, T., and U. PARSONS: Biochemic. J. **46**, 440 (1950). — ¹⁵ MANN, T., D. V. DAVIES and G. F. HUMPHREY: J. of Endocrin. **6**, 75 (1949). — ¹⁶ MOORE, C. R., W. HUGHES and F. GALLAGHER: Amer. J. Anat. **45**, 109 (1930). — ¹⁷ NELSON, W. O., and O. G. MERCKEL: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 825 (1937). — ¹⁸ PARKES, A. S.: Physiologic. Rev. **25**, 203 (1945). — ¹⁹ PRICE, D.: Amer. J. Anat. **60**, 79 (1936). — ²⁰ PRICE, D.: Physiologic. Zool. **14**, 145 (1945). — ²¹ PRICE, D., T. MANN and C. LUTWAK-MANN: Nature (Lond.) **164**, 950 (1949).

Dr. H. RAUSCHER, I. Universitäts-Frauenklinik Wien IX (Österreich).

Aus dem Radiologischen Institut der Universität Freiburg/Breisgau
und der Biophysikalischen Abteilung des Heiligenberg-Institut, Heiligenberg/Baden
(Direktor: Prof. Dr. H. LANGENDORFF).

Der Einfluß der Pantothensäure auf die adrenaletomierte Ratte.

Von

R. KOCH.

(Eingegangen am 14. Januar 1954.)

In früheren Versuchen fiel uns auf, daß bei mit Pantothensäure vorbehandelten Ratten eine Hemmung der postmortalen Glykogenolyse eintrat^{7, 8}. Untersuchungen an Mäuseleberbrei, dem gepufferte Glykogenlösung zugesetzt wurde, ergaben, daß auch unter diesen Bedingungen durch Zugabe von Pantothensäure in physiologischen Konzentrationen eine Hemmung des Glykogenabbaues erfolgt. Andere Beobachtungen mit Desoxycorticosteron unter vollständig gleichen Bedingungen zeigten ebenfalls eine Verzögerung der Glykogenolyse, wenn diese auch quantitativ etwas schwächer ausfiel (⁹ und zum Teil noch nicht veröffentlicht).

Nach diesen Befunden lag es nahe auf Zusammenhänge zwischen Nebennierenrinde und Pantothensäure zu achten.

Ausführliche Literaturangaben finden sich hierzu bei GRANADOS u. VERZÁR⁵. In diesen wird nachgewiesen, daß die normale Funktion der Nebennierenrinde nur dann gewährleistet ist, wenn der Organismus ausreichend mit Pantothensäure versorgt wird. Auch neuere Untersuchungen bestätigen diese Feststellung^{1, 17, 18}. Von den verschiedenen Beobachtungen interessieren, auch aus praktischen Erwägungen, besonders diejenigen von RALLI und seinen Mitarbeitern^{2-4, 10-16}. Diese Autoren untersuchten die Bedeutung der Pantothensäure für die Überlebenszeit adrenaletomierter Ratten. Sie wiesen nach, daß Pantothensäuremangel die Überlebenszeit der Tiere verkürzt. Andererseits glaubten RALLI und seine Mitarbeiter annehmen zu dürfen, daß die Applikation einer relativ großen Menge Pantothensäure bei entsprechender Kochsalzzufuhr adrenaletomierte Ratten länger am Leben zu erhalten vermag als Kochsalzgabe allein. In einzelnen ihrer Versuche war die Überlebenszeit entsprechend behandelter Tiere sogar länger als bei einer Substitution mit Cortin. Dieser Befund ist sehr auffallend und würde bei Bestätigung eine Fülle von Fragen nach sich ziehen. GRANADOS u. VERZÁR prüften die Angaben von RALLI u. Mitarb. nach. Auch sie können bestätigen, daß Pantothensäuremangel-Tiere nach Adrenaletomie empfindlicher sind und daß entsprechende Pantothensäuregaben zur Diät die Überlebenszeit der Ratten verlängert.

Aber weder aus den Versuchen von RALLI u. Mitarb., noch denen von GRANADOS u. VERZÁR kann geschlossen werden, ob bei einer normalen Kost mit ausreichenden Vitaminmengen die zusätzliche Gabe von größeren Pantothensäuremengen von Bedeutung ist; d. h. ob auf diese Weise

das Leben adrenalektomierter Ratten verlängert werden kann. Die Beantwortung dieser Frage erscheint uns aus 3 Gründen wichtig:

1. wäre dann die Pantothensäureversorgung bei der Haltung adrenalektomierter Tiere zu berücksichtigen, gegebenenfalls auch beim Morbus Addison,

2. wäre darin ein gewisser „Ersatz“ einer substituierenden Nebennierenrinden-Hormontherapie zu erblicken, was mit dem sehr ähnlichen Verhalten von Pantothensäure und Desoxycorticosteron bei der Glykogenolyse in der Leber in guter Übereinstimmung stünde und

3. beweisen alle bisherigen Untersuchungen lediglich, daß die Pantothensäure für eine normale Rindenfunktion wichtig ist und daß andererseits die Lebensbedingungen bei Ausfall der letzteren und zusätzlichem Mangel an Pantothensäure besonders erschwert werden.

Experimenteller Teil.

Zur Klärung der aufgeworfenen Frage stellten wir eine Reihe von Versuchen an. Wir verwendeten dazu einen eigenen Ratteninzuchtstamm (Albino). In einem Teil der Versuche erhielten die Tiere Mischfutter: Hafer, Fleisch und Garnelen sowie 2mal wöchentlich einen Brei aus Bäckerhefe, Weizenschrot und Lebertran. In den Tabellen sind diese Versuche mit „N“ gekennzeichnet.

In anderen Versuchen stellten wir folgende Diät zusammen:

Kokosfett (Palmin)	5,0%
Weizenmehl	68,0%
Magermilchpulver	17,7%
Hefe	6,0%
Lebertran	1,5%
Salzmischung	1,8%

Die Diät wurde täglich frisch zubereitet, wobei zunächst aus Weizenmehl, Magermilchpulver und Kokosfett ein Brei gekocht wurde, dem in abgekühltem Zustand der Lebertran, die Hefe (Bäckerhefe) und die Salzmischung hinzugefügt wurde. 400 g Brei setzten wir folgende Vitamine zu:

15 mg	Vitamin E
30000 E	Vitamin A
15 γ	Vitamin B ₁₂
0,75 mg	Folsäure
2,50 mg	Biotin
15,0 mg	Inosit
10,0 mg	Aneurin
4,0 mg	Lactoflavin
40,0 mg	Nicotinsäureamid
4,0 mg	Pyridoxin
6,0 mg	Pantothensäure

Die verwendete Salzmischung setzte sich folgendermaßen zusammen:

32,5 g	Natr. chlor.
24,8 g	Calc. lact.
18,3 g	Kal. phosph. prim.
6,5 g	Natr. phosph. sek.
5,1 g	Magn. sulf.
2,3 g	Ferr. citr.
0,1 g	Mangan. sulf.

Diese Diät ist in den Tabellen mit „D“ gekennzeichnet. Stets hatten die Tiere in ihren Käfigen ausreichende Futtermengen. Zu trinken erhielten sie nach der Adrenalectomie 1%ige NaCl-Lösung wie üblich und ad libitum. In einem Teil der Versuche wurden die Ratten morgens und abends sondiert und bekamen dabei jeweils 2,5 ml einer 1%igen Kochsalzlösung. Gleichzeitig hatten diese Tiere aber auch die Möglichkeit beliebige Mengen 1%iger NaCl-Lösung zu trinken.

In regelmäßigen Abständen wurden Gewichtskontrollen vorgenommen. Die auf die Kostform „D“ gesetzten Tiere erhielten diese schon 8—10 Tage vor der Adrenalectomie. Sie enthält alle Vitamine sehr reichlich, mithin auch Pantothensäure, so daß die zusätzliche Applikation von Pantothensäure die tägliche Gesamtzufuhr ganz beträchtlich erhöht. Auch die Kostform „N“ gewährleistet eine völlig normale Vitaminversorgung der Ratten.

Unsere Beobachtungen besprechen wir an Hand der folgenden Tabellen.

Tabelle 1.

Nr.	Tierzahl und Ge- schlecht	Kost	Gewicht	überlebend nach				durchschnittl. Überlebenszeit in Tagen	Behandlung
				10	20	30	40		
				Tagen					
1.	11 w. 9 m.	N	90—140 g 110—180 g	4 4	2 1	1 —	1 —	13,7 ± 5,4 12,3 ± 2,2	keine Sonde keine Pantoths.
2.	10 w. 10 m.	N	90—140 g 100—180 g	4 2	2 —	— —	— —	10,8 ± 2,6 9,4 ± 0,8	keine Sonde tgl. 50 mg Panto- thens. i. m.
3.	20 w.	N	100—160 g	17	7	2	—	18,9 ± 1,9	tgl. 2mal sondiert mit 1%iger NaCl-Lsg.
4.	11 w. 9 m.	N	100—130 g 90—130 g	1 2	— 1	— —	— —	6,9 ± 0,8 7,1 ± 2,0	tgl. 2mal sondiert m. 1%iger NaCl-Lsg. u. tgl. 50 mg Pantoth. i. m.
5.	15 w. 5 m.	N	145—205 g 185—320 g	3 (1)	1 (1)	— (1)	— —	6,9 ± 1,5 1,0 ± 0,0	tgl. sondiert mit 1%iger NaCl-Lsg.; 20 mg Ca-pantoth. per Sonde tgl.

Die Tab. 1 stellt den ersten Teil unserer Versuche dar. Unter Nr. 2 erhielten die adrenalectomierten Tiere täglich 50 mg „Bepanthen“ (Hoffmann-La Roche) intramuskulär injiziert. Das „Bepanthen“ ist der

der Pantothensäure entsprechende Alkohol. Wie ersichtlich, kommt es zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit, eher könnte man sogar an eine Verkürzung denken, jedoch sind die gewonnenen Differenzen nicht signifikant.

In unseren weiteren Versuchen gingen wir dazu über, die Ratten 2mal täglich zu sondieren (Gummisonde). Sie erhielten je Sonde 2,5 ml 1%ige NaCl-Lösung (Versuch Nr. 3—5). Diesen „Sondentieren“ stand außerdem noch 1%ige NaCl-Lösung in beliebiger Menge zum Trinken

Tabelle 2.

Nr.	Tierzahl und Ge- schlecht	Kost	Gewicht	überlebend nach				durchschnittl. Überlebenszeit in Tagen	Behandlung
				10	20	30	40		
				Tagen					
6.	9 w.	D	80—100 g	2	—	—	—	$6,6 \pm 1,6$	tgl. 2mal 2,5 ml 2%ige NaCl-Lsg. sondiert u. 10 mg Ca-pantoth./ Tier/Tag per Sonde
	11 m.		75— 90 g	4	(1)	(1)	—	$7,9 \pm 0,9$	
7.	10 w.	D	125—160 g	(2)	(2)	(2)	—	$5,6 \pm 0,6$	tgl. 2mal 2,5 ml 2% iger NaCl-Lsg. sondiert
	10 m.		85—150 g	4	3	(1)	—	$10,7 \pm 3,8$	

zur Verfügung. Es hat danach den Anschein, daß durch diese Maßnahme die Lebenserwartung der Tiere ansteigt (Versuch Nr. 3). Die mathematische Auswertung zeigt jedoch, daß sich die Unterschiede statistisch nicht sichern lassen ($P = \sim 0,35$). In Versuch Nr. 4 bekommen die Tiere neben der Sonde auch wieder 50 mg „Bepanthen“ intramuskulär injiziert. Die Überlebenszeit sinkt stark ab, die gefundene Differenz ist signifikant ($P < 0,01$). Ganz entsprechend verhalten sich die Tiere in Versuch Nr. 5 nach peroraler Zufuhr von Calcium-pantothemat.

Das Körpergewicht nach erfolgter Adrenalektomie wurde täglich beobachtet. Behandelte und unbehandelte Tiere verhielten sich vollständig gleich. Es trat bis zum Tod ein Gewichtsverlust ein, der zwischen 8 bis 25 g betrug.

Fassen wir unsere Beobachtungen zusammen, so zeigt sich, daß weder die zusätzliche Sondierung von Kochsalzlösung noch enterale oder parenterale Gaben von Pantethenol oder reiner Pantothensäure die Überlebenszeit verlängert.

Die auffallend langen Überlebenszeiten bei RALLI erscheinen uns unverständlich. Wie aus unseren Tabellen ersichtlich, erleben nur sehr wenige Tiere den 20. Tag nach dem Eingriff. In Versuch Nr. 5 z. B. überlebte ein Tier den 30. Tag. Wir setzten dieses Tier einer starken Abkühlung aus (STRESS) und beobachteten das Blutbild. Da es sich genau

so wie bei einer normalen Ratte verhielt (Senkung der Gesamtleukocyten und speziell der Lymphocyten) mußte funktionstüchtiges Nebennierengewebe vorhanden sein. Die Autopsie des Tieres bestätigte diese Annahme.

In den weiteren Untersuchungen glichen wir unsere Versuchsbedingungen den Voruntersuchern an. Vor allem lag uns daran, auch die übrigen B-Vitamine in reichlichem Maße den Tieren anzubieten. Tab. 2 stellt das Ergebnis dieser Untersuchungen dar. Zwischen der durchschnittlichen Überlebenszeit in Versuch Nr. 6 und 7 besteht kein Unterschied ($P > 0,7$). Dasselbe gilt für die Versuche Nr. 5 (Tab. 1) und 6 (Tab. 2). Bei den in Tab. 2 mit () versehenen Tieren handelt es sich um solche, die sich während der ganzen Beobachtungszeit wie normale Ratten verhielten. Sie zeigten entweder einen Gewichtsstillstand oder eine Zunahme. Es bestand daher der Verdacht einer unvollständigen Adrenalektomie. Die Vermutung wurde bestätigt, als beim Kältestress ein Absinken der Leukocyten eintrat und die Autopsie akzessorisches Nebennierengewebe im perirenaln Fettgewebe, besonders im Bereich des Nierenhilus finden ließ. Auch in den Versuchen 6 und 7 betrugen die Gewichtsverluste 5—35 g.

Da RALLI angibt, daß man die Kochsalzgabe erhöhen sollte, sondierten wir unsere Ratten in den Versuchen 6 und 7 mit 2%iger Kochsalzlösung. Die Tiere hatten zusätzlich noch die Möglichkeit beliebige Mengen einer 1%igen Kochsalzlösung zu trinken. Das Ergebnis zeigt, daß die erhöhte NaCl-Zufuhr ohne Bedeutung ist.

Diskussion und Zusammenfassung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung können somit die Angaben von RALLI u. Mitarb. nicht bestätigen, daß eine zusätzliche Zufuhr von Pantothensäure das Leben adrenalektomierter Ratten verlängert. Es gelingt dies weder bei Tieren, die ein gewöhnliches Mischfutter erhalten, noch bei solchen mit einer Diät. Letztere enthielt verhältnismäßig große Mengen aller für die Ratte lebensnotwendigen Vitamine einschließlich Pantothensäure. Zusätzlich erhielten diese Tiere noch 10 mg Pantothensäure/Tier und Tag per os. Die von uns aufgeworfenen Fragen finden damit ihre Beantwortung:

zu 1. Bei der Haltung adrenalektomierter Tiere ist lediglich für eine ausreichende Vitaminzufuhr zu sorgen. Eine zusätzliche Verfütterung von Pantothensäure ist nicht notwendig.

zu 2. Ein „Ersatz“ der substituierenden Steroidhormon-Therapie wird durch Pantothensäure nicht gewährt.

zu 3. Pantothensäuremangel macht adrenalektomierte Tiere empfindlicher.

Zur normalen Rindenfunktion ist Pantothensäure notwendig. Daraus darf jedoch nicht geschlossen werden, daß umgekehrt Zufuhr von Pantothensäure an normal gefütterte und adrenaletomierte Ratten die Überlebenszeit verlängert.

Wir danken an dieser Stelle der Deutschen Hoffmann-La Roche A. G. für das freundliche Überlassen der einzelnen Vitamine.

Nachtrag bei der Korrektur: Es wurde uns bekannt, daß BENDA und FREY in einer Diskussionsbemerkung in dem Symposium: Probleme des Hypophysen-nebennierenrindensystems. Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg, 1953, S. 68/69 auf die Wirkungslosigkeit der Pantothensäuregabe im Überlebenstest adrenaletomierter Ratten hinweisen.

Literatur.

- ¹ CASENTINI, S., A. LIBRETTI u. G. TUSINI: Arch. internat. Pharmacodynamie **92**, 217 (1952). — ² DUMM, M. E., u. E. P. RALLI: Endocrinology (Springfield, Ill.) **43**, 283 (1948). — ³ DUMM, M. E., u. E. P. RALLI: Endocrinology (Springfield, Ill.) **45**, 188 (1949). — ⁴ DUMM, M. E., u. E. P. RALLI: Fed. Proc. **9**, 1 (1950). — ⁵ GRANADOS, H., u. F. VERZAR: Internat. Z. Vitaminforsch. **24**, 403 (1952). — ⁶ IRWIN, L. J., u. E. P. RALLI: Amer. J. Physiol. **153**, 606 (1948). — ⁷ KOCH, R., u. J. BRÄUTIGAM: Internat. Z. Vitaminforsch. **21**, 214 (1949). — ⁸ KOCH, R., u. A. BOHLÄNDER: Z. exper. Med. **119**, 36 (1952). — ⁹ KOCH, R., u. A. BOHLÄNDER: Internat. Z. Vitaminforsch. **23**, 129 (1951). — ¹⁰ RALLI, E. P.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **39**, 225 (1946). — ¹¹ RALLI, E. P., M. E. DUMM u. P. ROTH: Federat. Proc. **7**, 1 (1948). — ¹² RALLI, E. P., u. J. GRAEF: Federat. Proc. **1**, 1 (1942). — ¹³ RALLI, E. P., u. J. GRAEF: Endocrinology (Springfield, Ill.) **32**, 1 (1943). — ¹⁴ RALLI, E. P., u. J. GRAEF: Amer. J. Physiol. **140**, 713 (1944). — ¹⁵ RALLI, E. P., u. J. GRAEF: Endocrinology (Springfield, Ill.) **37**, 252 (1945). — ¹⁶ SPOOR, H. J., u. E. P. RALLI: Endocrinology (Springfield, Ill.) **35**, 325 (1944). — ¹⁷ WINNTERS, R. W., R. B. SCHULTZ u. W. A. KREHL: Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 388 (1952). — ¹⁸ WINTERS, R. W., R. B. SCHULTZ u. W. A. KREHL: Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. **79**, 695 (1952).

Dr. R. KOCH, Heiligenberg-Institut Heiligenberg/Krs. Überlingen (Bodensee).

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. LUDWIG HEILMEYER).

Über Stoffwechselwirkungen von α -Tokopherolen, im besonderen untersucht an der Niere*.

Von

JOACHIM FREY.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Dezember 1953.)

Im Verlauf von Experimenten, die den üblichen Ablauf der Stoffwechselvorgänge in den Tubuluszellen und damit den Harnbereitungsvorgang der Nieren modifizieren sollten⁷, wurden α -Tokopherole in ihrer Eigenschaft als antioxidative Stoffe untersucht.

Der Senkung des Sauerstoffverbrauchs¹⁷ durch Tokopherole als Antioxydantien²⁶ entspricht eine Steigerung der O_2 -Zehrung bei tokopherolkarenzierten Tieren^{15, 22, 25, 27} (eigene Versuche). Dem Tokopherol wird weiter eine „regulierende“ Funktion für das hypophysär-diencephale System (Wasser-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel²⁰), sogar auch eine stimulierende Wirkung auf die ACTH-Cortison-Produktion²¹ zugesprochen. Einflüsse auf das Mesoderm sind unverkennbar²⁸. Aber trotz zahlreicher Arbeiten³⁴ sind die biologische Bedeutung und der therapeutische Wert des Vitamin E, vor allem seine eigentliche Aufgabe im Zellstoffwechsel, nur unbefriedigend geklärt, wenn auch Einflüsse auf einige enzymatische Reaktionen nachgewiesen werden konnten^{8, 17, 31}.

I. Unsere eigenen Versuche galten zuerst der *Einwirkung des Tokopherol auf den O_2 -Verbrauch verschiedener Körpergewebe* in vitro.

Hierzu dienten Atmungsversuche an verschiedenen Organgeweben mit der WARLURG-Apparatur. Es wurden 192 Einzelexperimente ohne, 132 mit Zusatz von dl- α -tokopherolestersaurem Natrium und 66 mit Zusatz von Pentamethyl-6-oxychroman-Phosphat (ohne Phytylseitenkette des Vitamin E) ausgeführt**. Als Suspensionsflüssigkeit für die Gewebsschnitte mußte statt RINGERLösung⁹ diesmal physiologische NaCl-Lösung benutzt werden, da es sonst zu Ausfällungserscheinungen unter anderem mit dem Tokopherolzusatz kam; dementsprechend ist die O_2 -Atmung der Schnitte geringer. Die Versuche erstreckten sich vom November 1949 bis November 1952.

Abb. 1 (rechte Seite) stellt die Einwirkung von 5 mg der beiden „Tokopherole“ pro 1 ml 0,85%ige NaCl-Lösung als Suspensionsflüssigkeit auf Schnitte verschiedener Körpergewebe der Ratte dar. Es tritt eine zum Teil sehr *starke Hemmung der O_2 -Zehrung* ein. Die *Muskulatur von Herz und Skelet* — für letztere bereits beobachtet³ — atmet unter

* Prof. ERNST FREY zum 75. Geburtstag gewidmet.

** Diese Substanzen sowie dl- α -Tokopherolacetat wurden von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

der gewählten Dosis nur noch etwa halb so stark wie vorher, während der O_2 -Verbrauch von *Gehirn und Embryonalrückstand* (0,5 ml Hühnereiflüssigkeit nach 9 Tagen Bebrütung) um etwa $\frac{1}{3}$ reduziert ist. Die starke *Nierenatmung* wird durch Tokopherol um durchschnittlich 20% gehemmt.

Anders verhält sich jedoch die *Leber* mit einer *Steigerung des O_2 -Verbrauchs* um 25%. Diese Sonderstellung der Leber sei besonders hervor-

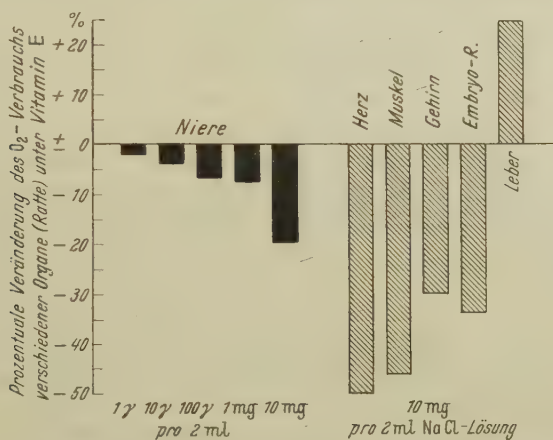


Abb. 1. Prozentuale Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs verschiedener Organe (Ratte) unter Vitamin E (dl- α -tokopherolphosphorestersaures Natrium). — Rechts (schraffierte Säulen): Einwirkung von Tokopherol auf die Atmung von Schnitten verschiedener Gewebe; bei einer Dosis von 10 mg Tokopherol pro 2 ml Suspensionsflüssigkeit kommt es zu starker Senkung des O_2 -Verbrauchs (QO_2) von Herz- und Skelettmuskulatur, Gehirn und Embryonalrückstand, während bei gleicher Tokopheroldosis Leberschnitte eine Förderung der Atmung (+ 20%) aufweisen. — Links (schwarze Säulen): dosisabhängige Atmungsminderung von Nierenschnitten (Gesamtorgan).

gehoben, da sie eine gleichförmige antioxydative Aktion der beiden Substanzen widerlegt und für dieses Organ bei einer Dosierung von 5 mg/1 ml einen oxydativen Effekt nachweist. 50 mg und darüber bewirken jedoch auch am Lebergewebe eine Hemmung bis Aufhebung der Atmung.

Bei Untersuchungen des Gesamtstoffwechsels mit Tokopherolanwendung muß demnach berücksichtigt werden, daß die Tokopheroleinwirkung auf Leber und übriges Organewebe in Abhängigkeit von der Dosis gegensinnig verlaufen kann; das gilt sowohl für das Vitamin E in seiner üblichen Zusammensetzung (Phytylchroman, hier dl- α -tokopherolphosphorestersaures Na) wie für das Grundskelet (Chroman ohne Phytylseitenkette, hier Pentamethyl-6-oxychroman-Phosphat).

Am Substrat der Niere (Rinde) wurde erprobt, ob hier ebenfalls eine Abhängigkeit der antioxydativen Wirkung von der Dosis besteht. In Abb. 1 (linke Seite, schwarze Säulen) ist dargestellt, daß mit Zunahme der Tokopheroldosis auch eine Zunahme der Atmungshemmung zustande kommt. Am Homogenat der Niere (Gesamtorgan) läßt sich ebenfalls die antioxydative Wirkung des dl- α -tokopherolphosphorestersauren

Na (10 mg pro 0,125 g Frischgewicht Niere) feststellen: in 12 Einzelversuchen fiel im Vergleich zu 13 Einzelkontrollen der O_2 -Verbrauch nach der 1. Std im Durchschnitt um 47%, nach der 2. Std um 56%. — Homogenisiertes Lebergewebe der Ratte zeigte in 70 Einzelversuchen und 53 Kontrollen bei Tokopherolzusatz von 0,1 mg und 1,0 mg pro 2 ml Lösungsflüssigkeit, die ebenfalls 0,125 g Frischgewicht Leber enthielt, im Durchschnitt keine signifikanten Änderungen der Atmung, jedoch trat ab 10 mg/2 ml in der 1. Std eine Depression um 46% ein. Die Förderung der Atmung von Leberschnitten durch Tokopherol ist demzufolge nach Homogenisierung nicht mehr deutlich, scheint also auf ein intaktes morphologisches Substrat beschränkt.

Später mitzuteilende Versuche werden zeigen, in welcher Stärke Tokopherole in die energieliefernden Prozesse der Zellen (Nierentubuli) eingreifen können.

II. Die antioxydative Wirkung der Tokopherole wurde weiter in ihrem Einfluß auf die Funktion des Muskels untersucht, um einen Vergleich mit einer Zellfunktion (hier Muskelkontraktion) zu haben. Zuerst seien Ergebnisse aus Versuchen am *Skelettmuskel* des Kaltblüters wiedergegeben.

Hierzu dienten Esculenten und Temporarien, deren Sartorii, in einer Badflüssigkeit (RINGER) ohne und mit Tokopherol (dl- α -Tokopherolacetat) suspendiert, direkt elektrisch gereizt wurden mit Registrierung der Muskelkontraktionen auf ein Rußkymographion. Die Versuche wurden im September/November 1941 im Pharmakologischen Institut Göttingen (unter E. FREY) ausgeführt.

Zwei Beispiele sollen die Ergebnisse aufzeigen. 1. *Rana escul.* (15. 9. 41). Alle 5 min tetanische Reizung von 20 sec Dauer. Muskelzuckungshöhe in Prozenten der Ausgangshöhe.

2. *R. escul.* (11. 9. 41.). Alle 5 min eine Serie von Einzelreizen (Abb. 2).

Tabelle 1.

Zeit min	Höhe der Muskelzuckung		Zeit min	Höhe der Muskelzuckung	
	mit Tokopherol %	ohne Tokopherol %		mit Tokopherol %	ohne Tokopherol %
0	100	100	45	32	9
5	114	102	50	29	9
10	98	91	55	27	7
15	68	73	60	25	5
20	50	37	65	25	7
25	43	25	70	25	7
30	40	18	75	23	2
35	36	7	80	21	2
40	32	7			

Die mitgeteilten Beispiele zeigen, daß unter *Tokopherol* jedesmal eine deutliche *Ermüdungshemmung des Skelettmuskels* eingetreten ist, und zwar bei verschiedenartiger Applikation der Kontraktionsreize, sei es,

daß es sich um rhythmisch wiederholte Einzelreize oder um wiederholte Tetani oder um Serien von Einzelreizen handelt. In allen Versuchen sind gegenüber den Kontrollen längerdauernde bzw. größere Kontraktionen

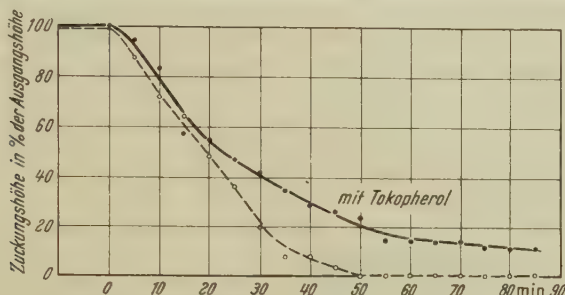


Abb. 2. Ermüdungshemmung durch Tokopherol am Kaltblütermuskel (*M. sartorius* von *Rana esculenta*): gestrichelte Kurve Kontraktionen des Kontrollmuskels auf eine Serie von direkten Einzelreizen (alle 5 min), ausgezogene Kurve Muskelkontraktionen des anderen Sartorius des gleichen Tieres bei gleicher Reizsetzung. Zuckungshöhen in Prozenten der Ausgangshöhe.

um 10—100% zustande gekommen. Auch bei Zusatz von Coffein (1 : 1500) ist die ermüdungshemmende Wirkung des Tokopherol nachweisbar.

Schließlich wurde noch untersucht, wie sich Gifte verhalten, die als Fermentlähmer die Redoxkatalysatoren beeinflussen: Monojodessigsäure und Cyankali. Hierfür zwei Beispiele.

1. *R. escul.* (29. 9. 41). Beide Sartorii in Bad von Monojodessigsäure (0,08% ig); ein Bad mit Tokopherol gesättigt. Alle 5 min eine Serie von Einzelzuckungen. Zahlen — Zuckungsgröße in Prozenten der Ausgangshöhe.

2. *R. escul.* (25. 9. 41). 0,01% Cyankali. Alle Sekunden ein Einzelreiz.

Die antioxydative Eigenschaft des Tokopherols hat demnach einen schützenden Effekt gegen die Giftwirkung der Monojodessigsäure und des Cyankali, wie später auch für Alloxan¹⁸, Tetrachlorkohlenstoff²³ und o-Trikresylphosphat¹⁶ gefunden wurde. Mit anderen Worten: durch die Stoffwechselgröße (O_2 -Verbrauch) des Skelet-

muskels wird die Schnelligkeit der Giftwirkung bestimmt.

Tabelle 2.

Zeit min	Höhe der Muskelzuckung	
	mit Tokopherol %	ohne Tokopherol %
0	100	100
5	100	93
10	108	90
15	72	75
20	60	51
25	48	30
30	32	6
35	12	0
40	4	0

Tabelle 3.

Zeit min	Höhe der Muskelzuckung	
	mit Tokopherol %	ohne Tokopherol %
0	100	100
5	43	34
10	3	0

Am *Herzmuskel* des Warmblüters (LANGENDORFF-Herz des Meer-schweinchens) wurde in gemeinsamen Untersuchungen mit G. HOFFMANN gefunden, daß kleinere Dosen von dl- α -tokopherolphosphoresaurem Natrium ($1-5 \text{ g} \cdot 10^{-7}$) eine mäßige positiv inotrope Wirkung bei fehlender oder nur geringer Abnahme des Koronardurchflußvolumens ausüben. Größere Dosen (ab $1 \cdot 10^{-6}$) führen zu Verkleinerung des Koronardurchflußvolumens mit negativ inotroper Wirkung auf das Herz, das schließlich in Mittelstellung zwischen Systole und Diastole stehen bleibt als Ausdruck dafür, daß der Wiederaufbau der Kontraktionssubstanz weder schnell noch langsam behindert ist (E. FREY¹⁰).

Diese Versuche, die gesondert ausführlich mitgeteilt werden, bestätigen die Befunde von VACCARI³³ an Frosch und Kaninchen. — Am stillstehenden Herz wird das Durchflußvolumen der Kranzgefäße bereits durch kleinere Tokopheroldosen ($1 \cdot 10^{-7}$) deutlich vermindert, während sie am schlagenden Herzen nicht oder kaum gefäßkonstringierend sind. Der *tätige Herzmuskel paralyisiert* also *einen gefäßkonstriktorischen Reiz* (innerhalb einer bestimmten Dosierung), wie es REIN³⁰ ebenfalls für das Adrenalin fand. Es ist demnach nicht statthaft, aus der Wirkung eines Stoffs am isolierten Gefäß oder am Gefäß des ruhenden Organs auf diejenige am tätigen Organ zu schließen.

III. Nach den Stoffwechseluntersuchungen wurde nun der *Einwirkung des Tokopherols auf die Nierenfunktion* nachgegangen. Dabei bestätigt sich der Befund anderer Autoren^{20, 2, 5, 1}, daß unter dl- α -Tokopherolacetat (Ephynal Roche) eine Zunahme des Harnvolumens eintritt.

Tabelle 4.

Vp.	Versuchsdauer Tage	durchschnittliche Harnmenge pro Tag		Harnsteigerung	E-Dosis pro Tag
		ohne Vit. E	mit Vit. E		
Fi. ♂	je 7	950 ml	1005 ml	+11%	200 mg
Na. ♀	6	1175 ml	1290 ml	+10%	170 mg
Ne. ♀	5	935 ml	1470 ml	+57%	180 mg

Es läßt sich am Menschen zeigen (Versuche von Mai/Juni 1951), daß durch Tokopherol eine Harnmengenzunahme (Diurese) von 10—50% eintritt.

Diese Steigerung des Harnvolumens unter Tokopherol ist jedoch *nicht* mit einer *Erhöhung der Uropepsinausscheidung* verbunden, die als Anzeichen einer gesteigerten ACTH-Ausschüttung aus der Prähypophyse angesehen wird^{4, 29, 32}. Wir können also nach dem Ergebnis des Uropepsintests nicht der Ansicht zustimmen, daß Tokopherol eine ACTH-Vermehrung bewirke²¹; die Schwankungen der täglichen Pepsinausscheidung mit dem Harn waren bei 4 Vp. mit und ohne Tokopherol in unseren Versuchen die üblichen.

In der Literatur war bislang nur von einer jeweiligen Harnvermehrung durch Tokopherole die Rede; es blieb jedoch unberücksichtigt, welcher Art diese Tokopheroldiurese war, was für die Arbeitsweise der Nieren jedoch wichtig ist^{7, 11}. Deshalb wurden detaillierte *Diureseversuche* an Mäusen angestellt.

Hierzu diente ein Kollektiv von 54 Mäusen, die bei gleichem Futter unter den gleichen Bedingungen je 9 Tage lang während einer Vorperiode und einer Tokopherolperiode beobachtet wurden. Während 4 Std wurde täglich der Harn gesammelt und analysiert: Menge, Konzentration (Gefrierpunkt), Chlor (als NaCl berechnet) und Harnstoff. Die Tokopheroldosis war 10 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaures Natrium pro kg Maus pro Tag, unmittelbar vor der Harnsammelperiode subcutan gegeben. Das Gewicht der Mäuse betrug 17–25 g und war durchschnittlich 21 g pro Maus vor Beginn der Versuche, 22 g pro Maus nach dem 18-tägigen Versuch (September 1952).

Abb. 3 zeigt die Tokopheroldiurese: Harnvolumen und absolute NaCl-Ausscheidung pro 4 Std nahmen um rund 100% zu, während die Harn-

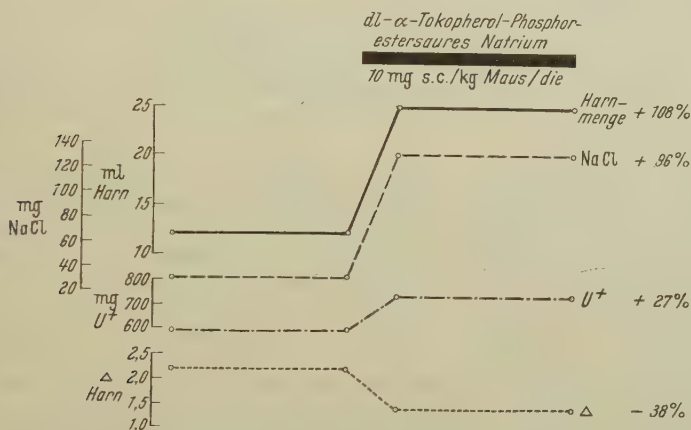


Abb. 3. Veränderungen von Harnmenge und Harnzusammensetzung unter Tokopherol (Harnmenge, Harnkonzentration, Chloride als NaCl, Harnstoff): bei einer Dosis von 10 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaures Na subcutan pro kg Maus pro Tag kommt es zur Steigerung des Harnvolumens (+ 108%) und der Chloridausscheidung (+ 96%) bei Abfall der Harnkonzentration (- 38%): Filtrationsdiurese. Harnausscheidung von 54 Mäusen (Summenwerte) über 4 Std.

konzentration sich um 38% erniedrigte. Dieses Verhalten des Harns charakterisiert die *Tokopheroldiurese* als *Filtrationsdiurese* (J. FREY¹²): läge eine Wasserdiurese¹³ vor, so müßte die Harnkonzentration proportional der Zunahme des Harnvolumens um 55% abgesunken sein (von Delta — 2,26° auf — 1,05°), was nicht der Fall ist (Delta = — 1,41°).

Zunahme der absoluten Chloridausscheidung bei gleichzeitiger Diurese (= Zunahme des Harnvolumens) ohne entsprechende Abnahme der Gesamtkonzentration sind die Zeichen der Diurese des genannten Typs. Die Tokopheroldiurese ist also eine Filtrationsdiurese. Dies läßt sich ebenfalls aus der Ausscheidung des gesamten osmotischen Guts entnehmen: während der Vorperiode wurden 14,7 mOsmol/4 Std/54 Mäuse ausgeschieden, während der Tokopherolperiode 19,1 mOsmol/4 Std/54 Mäuse. Wenn die Harnvolumenzunahme von 13,1 ml/4 Std/54 Mäuse durch eine reine Filtrationsdiurese zustande gekommen ist, so müßte

sich das gesamte osmotische Gut auf 18,6 mOsmol/4 Std/54 Mäuse erhöht haben; dies ist also tatsächlich der Fall, und der geringe Unterschied von 0,5 mOsmol dürfte auf der Zunahme des durchschnittlichen Körpergewichts der Tiere von 21 auf 22 g pro Maus während der Versuchsdauer von 18 Tagen beruhen. — Bei der Filtrationsdiurese durch Tokopherol nimmt die absolute Harnstoffausscheidung (Abb. 3) um 27% zu, was sonst bei Filtrationsdiuresen nicht immer üblich ist⁹; dies kann seine Ursache in einer Beeinflussung des Eiweißstoffwechsels haben, wie sie von einigen Untersuchern gefunden wurde^{6, 24}; dieser Frage wurde nicht weiter nachgegangen.

Nach der Charakterisierung der Tokopheroldiurese war es noch von Interesse, den Einfluß des Antioxydans auf eine Wasserdurese experimentell im einzelnen zu prüfen, zumal sich diese Diureseart in ihrem Mechanismus von der Filtrationsdiurese grundsätzlich unterscheidet^{12, 13}.

Zum Versuch dienten wiederum Mäuse, die ebenfalls Weizenkörner, Semmel und Wasser zur Nahrung bekamen. Die Wasserdurese wurde durch orale Gabe von Leitungswasser erzielt. Einer Vorperiode, während der die Harnproduktion 9 Tage lang jeweils über eine Zeit von 4 Std beobachtet wurde, schloß sich eine Periode mit Wasserdurese an: jedes Tier erhielt unmittelbar vor dem Versuch 1 ml H₂O in den Magen und nach 1 Std nochmals die gleiche Menge oral. Eine dritte Periode schloß sich mit gleichen Wassergaben unter subcutaner Injektion von 10 mg dl- α -tokopherolphosphoresaurem Na pro kg Maus pro Tag an. Wiederum wurden Harnmenge, Gesamtkonzentration, Chloride (ausgedrückt als NaCl) und Harnstoff im Harn von 4 Std bestimmt.

Eine Übersicht über die Resultate gibt die folgende Tabelle. Es wurde für die Auswertung der Ergebnisse eine Gruppierung der Tierkollektive (je 6 Mäuse umfassend) in der Art vorgenommen, daß solche zu einer Gruppe zusammengefaßt wurden, deren Harnproduktion im Wasserversuch kleiner als 12 ml/4 Std (Gruppe I), gleich 12 ml/4 Std (Gruppe II) und größer als 12 ml/4 Std (Gruppe III) war; diese Einteilung entspräche einer gleichen bei nierengesunden Menschen, die im Wasserversuch eine verringerte, normale und überschießende Diurese aufweisen, wie sie der Klinik hinlänglich bekannt sind. Eine Zusammenfassung aller Resultate in einem jeweils einzigen Wert würde die hier interessierenden Fragen sonst wenig erkennen lassen.

Aus der Tab. 5 wird ersichtlich, daß eine orale Gabe von durchschnittlich 0,1064 ml Wasser pro g Maus (die einer Menge von 6,38 l bei einem 60 kg schweren Menschen entsprechen würde) von den Tieren unterschiedlich behandelt wird: es kann Flüssigkeit retiniert werden (Gruppe I A 2), die Ausscheidung kann fast derjenigen der Aufnahme entsprechen (Gruppe II A 2) oder es vermag die Diurese überschießend zu sein (Gruppe III A 2). Das Verhalten der absoluten Chlorausscheidung (ausgedrückt als NaCl) gibt Aufschluß darüber, in welcher Weise der extravasale Anteil des extracellulären Raums an der Wasseraufnahme und -abgabe mitbeteiligt ist. Zuerst ist allgemein eine gering vermehrte Chlorausscheidung bei der starken Wasserbelastung zu erkennen, da der

Wasserdeponierungsvorgang im extracellulären Raum Chlor mitreißt, das nachher von den Nieren mitausgeschieden wird; bei einer geringeren Wasserzufuhr (0,025 ml/g Maus) oral bleibt die Chlorbilanz ausgeglichen. Zum zweiten läßt sich erkennen, daß bei H_2O -Retention auch weniger Chlor (I B 2), bei überschießender Diurese erheblich mehr Chlor (III B 2)

Tabelle 5.

Gruppe	Tierzahl	A Harnvolumen			B Harnchlor		
		1 Vor- periode ml/g/4 Std	2 H_2O - periode ml/g/4 Std	3 H_2O +E- periode ml/g/4 Std	1 Vor- periode mg/g/4 Std	2 H_2O - periode mg/g/4 Std	3 H_2O +E- periode mg/g/4 Std
I < 12 ml Harn	12	0,0163 ± 0%	0,0871 + 434%	0,1266 + 678%	0,1167 ± 0%	0,1263 + 8%	0,2052 + 76%
II = 12 ml Harn	6	0,0127 ± 0%	0,1003 + 690%	0,0994 + 683%	0,1000 ± 0%	0,1017 + 10%	0,1225 + 12%
III > 12 ml Harn	36	0,0110 ± 0%	0,1152 + 948%	0,0954 + 767%	0,1117 ± 0%	0,1295 + 25%	0,1425 + 28%

ausgeschieden wird als bei equilibrierter Diurese (II B 2); die mitausgeschwemmte Gewebsflüssigkeit bei einer übergroßen Wasserdiurese führt viel Chlor mit aus: + 25% im Beispiel III B 2 der Tab. 5.

Gibt man nun zur Wasserdiurese zusätzlich das Antioxydans (10 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaures Na/kg), also einen Stoff, der nach den vorausgegangenen Experimenten zu einer Filtrationsdiurese führt, so ändern sich die Harnmengen: die Wasserretention wird ebenso normalisiert (I A 3), wie die überschießende Diurese der Norm angenähert wird (III A 3), während die „Normaldiurese“ in ihrem Volumen unbeeinflusst erscheint (II A 3). Die Kochsalzausscheidung bei der Wasser-Tokopherol-Diurese läßt erkennen, daß die Normalisierung der Flüssigkeitsbilanz durch Tokopherol im Falle einer Retention durch eine Flüssigkeitsmobilisierung unter Mitausscheidung von Chlor (I B 3) bewerkstelligt wird, im Falle der überschießenden Diurese durch eine Reduktion der auszuscheidenden Flüssigkeitsmengen, und zwar nicht mit Verminderung, sondern unter leichter Steigerung der absoluten Chlorelimination (+ 25%); letztes bedeutet vor allem eine Senkung der Ausscheidung reinen Wassers.

Zusammengefaßt läßt sich aus diesen Versuchen über die Interferenz der beiden Diuresearten sagen, daß das oxydationshemmende Tokopherol einmal den filtrativen Prozeß der Nieren steigert, zweitens den sauerstoff-

zehrenden Vorgang der Wasserausscheidung hemmt. Ob sich dabei die Gesamtharnmenge ändert oder nicht, hängt vom Ausmaß der Flüssigkeitsbindung und -menge im extracellulären Raum ab.

IV. Besprechung der Ergebnisse.

Die Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs der Tubuluszellen durch eine antioxydative Substanz (hier Tokopherol) bedeutet einen solchen Eingriff in die tubulären Zellvorgänge⁷, daß die übliche Harnbereitung mit Herstellung eines konzentrierten Harns verändert wird. Es entsteht eine Harnvermehrung, die nach dem Typ der Filtrationsdiurese verläuft. Das Tokopherol ist zwar an sich ein gefäßkonstriktorischer Stoff (siehe Abschnitt II), führt aber z. B. im schlagenden Herzmuskel bei niedrigen Tokopheroldosen keine Gefäßkonstriktion herbei. Da auch die Niere ihrem funktionellen Zustand nach nicht dem ruhenden, sondern dem tätigen Muskel analog ist, wird es erklärlich, warum Tokopherol in diesem Organ mit seiner starken O₂-Zehrung nicht die Vorbedingungen einer Filtrationsdiurese ausschaltet, nämlich eine Gefäßdilatation¹². Vielmehr wird die antioxydative Wirkung des Tokopherol und der offenbar durch sie verursachte Rückgang der enzymatisch bedingten Energielieferung als derjenige Eingriff in den tubulären Stoffwechsel angesehen, der — wie ich meine — nervös-reflektorisch¹⁴ zur Gefäßdilatation führt.

Warum die Filtrationsdiurese ihrerseits wiederum auf die tubuläre Leistungsfähigkeit (Transfermechanismen für Harnfixa) rückwirkt, wird hier nicht auseinander gesetzt; das soll erst geschehen, wenn noch mehr Versuchsergebnisse vorliegen, obwohl die Grundvorgänge bereits erkennbar sind.

Da die antioxydative Wirkung des Tokopherol zu einer Filtrationsdiurese führt, wird es erklärlich, in welcher Weise dieser Stoff eine Wasserdurese modifiziert. Diese beansprucht — im Gegensatz zur Filtrationsdiurese — eine besondere Sauerstoffquote (J. FREY¹²) und die Interferenz von Filtrations- und Wasserdurese bringt es mit sich, daß je nach der Ausgangslage die Harnmengen Zunahme gesteigert oder verringert werden kann, wie das detaillierte Experiment nachweist (Abschnitt III). Nach oraler Aufnahme einer größeren Wassermenge (der Grundbedingung für eine Wasserdurese nach E. FREY¹³) kann eine etwaige Wasserretention durch das Hinzukommen einer durch Tokopherol ausgelösten Filtrationsdiurese beseitigt werden, wie andererseits eine überschießende Wasserdurese durch den antioxydativen Effekt des Tokopherol auf eine reine Wasserdurese zu reduzieren ist. Es ist also die direkte Wirkung der Substanz auf die Niere, die einen solchen „normalisierenden“ Effekt als Einfluß auf die peripheren Organe^{27, 3} hervorrufen kann, während eine Einwirkung des Tokopherol auf hypophysär-diencephale Zentren^{20, 1} bislang unbewiesen ist. Demnach läßt sich nicht von einer „regulierenden“

Tätigkeit dieser Substanzen durch Vermittlung der Zentren sprechen, sondern nur von einer *Reaktion* der Tubuluszellen auf den antioxydativen Eingriff.

Zusammenfassung.

Tokopherolsubstanzen (dl- α -tokopherolphosphorestersaures Na, dl- α -Tokopherolacetat, Penta-methyl-6-oxychroman-Phosphat) bedingen

a) in vitro:

Oxydationshemmungen von Niere, Herz, Skelettmuskel und Embryonalrückstand, nicht von Leber (Ratte). Diese antioxydative Wirkung ist dosisabhängig.

b) in vivo:

1. Ermüdungshemmung des Skelettmuskels des Kaltblüters (Frosch) und Verminderung der Toxizität von Monojodessigsäure und Cyankali für diesen Muskel.

2. Bei Dosen von 1 bis $5 \cdot 10^{-7}$ eine mäßig positiv inotrope, ab $1 \cdot 10^{-6}$ eine negativ inotrope Wirkung auf das schlagende Warmblüterherz (Meerschweinchen), wobei sich jetzt — wie beim stillstehenden Herzen — eine Koronarkonstriktion durchsetzt.

3. Eine Diurese (Ratte, Mensch) nach dem Typ der Filtrationsdiurese (Ratte). Durch Interferenz der Filtrationsdiurese mit einer Wasserdurese kann bei nicht equilibriertem Wasserhaushalt eine Harnmengenvermehrung wie -verringerung eintreten.

Literatur.

- ¹ BECKER-FREYSENG, H.: Klin. Wschr. 1951, 649. — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 214, 411 (1952). — ² BIRD, CULTON u. KLINE: zit. nach BECKER-FREYSENG. — ³ BRAUNSTEINER, H., u. F. MLZCOCH: Experientia (Basel) 6, 234 (1950). — ⁴ BUCHER, K.: Gastroenterologia (Basel) 8, 627 (1947). — ⁵ DAM, H., u. J. GLAWIND: zit. nach BECKER-FREYSENG. — ⁶ DAM, H.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 55, 55 (1944). — ⁷ FREY, J.: Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 58, 200 (1952). — ⁸ FREY, J.: Klin. Wschr. 1949, 348. — ⁹ FREY, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 216, 473 (1952). — ¹⁰ FREY, E.: Pflügers Arch. 184, 156 (1920). — ¹¹ FREY, J.: Dtsch. med. Wschr. 1950, 1482. — ¹² FREY, E., u. J. FREY: Die Funktionen d. gesunden u. kranken Niere. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — ¹³ FREY, E.: Pflügers Arch. 112, 71 (1906). — ¹⁴ FREY, J.: Urologia (Ital.) 6, 461 (1952). — ¹⁵ FRIEDMANN, TH. E., u. H. A. MATILL: Amer. J. Physiol. 131, 595 (1940/41). — ¹⁶ GLOCK, W., u. A. HOTTINGER: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 13, 9 (1943). — ¹⁷ GOVIER, W. M., u. W. W. JETTER: Science (Lancaster, Pa.) 107, 146 (1948). — ¹⁸ GYÖRGI, P., u. C. S. ROSE: Science (Lancaster, Pa.) 168, 716 (1948). — ¹⁹ HEINSEN, H. A., u. Mitarbeiter: Med. Klin. 1947, 823. — Dtsch. Arch. klin. Med. 193, 157 (1948). — ²⁰ HEINSEN, H. A.: Dtsch. Arch. klin. Med. 194, 236 (1948). — Dtsch. med. Wschr. 1949, 149, 908; 1951, 70. — Med. Klin. 1950, 254. — Ther. Gegenw. 1952, 281. — ²¹ HEINSEN, H. A., H. KÖKER u. H. SCHEFFLER: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 57, 118 (1951).

— ²² HOUPGHIN, O. B., u. H. A. MATILL: J. of Biol. Chem. **146**, 301 (1942). — ²³ HOVE, E. L.: Federat. Proc. **7**, 290 (1948). — HOVE, E. L., K. C. D. HICKMAN u. P. L. HARRIS: Arch. of Biochem. a. Biophysics **8**, 395 (1945). — ²⁴ HOVE, E. L., u. P. L. HARRIS: J. Nutrit. **34**, 571 (1947). — HOVE, E. L.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **63**, 508 (1946). — ²⁵ KAUNITZ, H., u. A. M. PAPPENHEIMER: Amer. J. Physiol. **138**, 328 (1943). — ²⁶ LUNDBERG, W. O., R. H. BARNES, M. CLAUSSEN, N. LARSON u. G. O. BURR: J. of Biol. Chem. **168**, 379 (1947). — ²⁷ MARKEES, S.: Helvet. med. Acta **15**, 528 (1948). — ²⁸ MARKEES, S.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **12**, 335 (1950). — ²⁹ MIRSKY, J. A., u. Mitarbeiter: J. Clin. Invest. **27**, 817, 834 (1948). — ³⁰ REIN, H., u. Mitarbeiter: Pflügers Arch. **237**, 455 (1936). — ³¹ SPAULDING, E. H., u. E. F. GRAHAM: J. of Biol. Chem. **170**, 711 (1947). — ³² SPIRO, M., R. W. REIFENSTEIN u. S. J. GRAY: J. Labor. a. Clin. Med. **35**, 899 (1950). — ³³ VACCARI, F.: Cuore **35** (1951). — ³⁴ VOGEL, H., u. H. KNOBLOCH: Chemie u. Technik d. Vitamine. Stuttgart: Encke 1950.

Prof. Dr. med. JOACHIM FREY, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. LUDWIG HEILMEYER).

Untersuchungen am isolierten Warmblüterherzen über die Wirkung des dl- α -Tokopherol*.

Von

JOACHIM FREY und GÜNTHER HOFFMANN.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Dezember 1953.)

In einer vorausgegangenen Mitteilung wurde über die Wirkung von α -Tokopherol auf die Leistung der eindickenden und der in „Wasserdiurese“ befindlichen Niere sowie auf die Skeletmuskulararbeit berichtet¹. Es wurde unter anderem gefunden, daß die Kontraktionen des isolierten *M. sartorius* von Fröschen gegenüber Kontrollen deutlich verbessert waren, was als eine Ermüdungshemmung anzusehen ist. Im Hinblick auf die von SHUTE⁷ eingeführte Behandlung von cardiovasculären Krankheiten mit Vitamin E schien uns eine eingehende Prüfung dieses Stoffes am isolierten Herzmuskel angezeigt.

Methodik. Wir untersuchten die isolierten Herzen von Meerschweinchen, welche in der Anordnung nach LANGENDORFF⁵ durchströmt wurden. Präparationen und Fixierung erfolgten entsprechend der früher angegebenen Weise². In Abänderung davon benutzten wir zum Druckausgleich der mit O₂ durchperlten Kanüle ein von HOFFMANN³ angegebenes Ventil. Die Temperatur wurde auf 36° C ($\pm$ 0,1) konstant gehalten. Registriert wurden die Kontraktionen des Herzens, sein Coronardurchfluß und seine Frequenz. Vor Versuchsbeginn wurden die Herzen jeweils $\frac{1}{2}$ Std beobachtet. Tokopherol kam als dl- α -tokopherolphosphorestersaures Natrium zur Anwendung. Da das Präparat beim längerem Stehen und besonders in höheren Konzentrationen leicht ausfällt, wurde nicht — wie üblich — auf eine Durchströmung mit konstanter Konzentration umgeschaltet, sondern es wurden die einzelnen Mengen Tokopherol jeweils in die Zuflußkanüle des Herzens injiziert, deren Inhalt 10 ml RINGER betrug und von O₂-Durchperlung dauernd energisch durchmischt wurde. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf diesen Kanüleninhalt von 10 ml.

I. Für den Bereich einer *Dosis* von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-7}$ war die *Wirkung des Tokopherol* recht wechselnd: es fanden sich sowohl Steigerungen als auch Depressionen von Amplitude, Frequenz und Coronardurchfluß. Im Mittel betrugen alle Veränderungen etwa 10%, sie sind daher nicht sicher zu verwerten. Hervorgehoben sei, daß nach der Sofortwirkung der genannten Dosis im weiteren Verlauf eine *mäßige Stimulierung* sichtbar wurde, vornehmlich eine Vergrößerung der Amplitude. Dabei wird nicht

* Prof. ERNST FREY zum 75. Geburtstag gewidmet.

jede Einzelkontraktion vergrößert; auch ist die Frequenz im Anschluß an eine Amplitudenverbesserung oft unregelmäßig. — Abb. 1 bringt ein Beispiel: nach einer Gabe von $3 \cdot 10^{-7}$ Tokopherol wurde die Amplitude um insgesamt 10% der Ausgangshöhe vergrößert, während Frequenz und Coronardurchflußvolumen pro Min. gleich blieben.

Bei der Dosis von $5 \cdot 10^{-7}$ fiel eine gewisse *Kumulation* auf, wenn im Abstand von 30 min getestet wurde. Die anfängliche geringe positiv inotrope Wirkung schlug in eine deutlich negativ inotrope um.

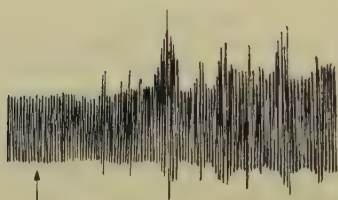
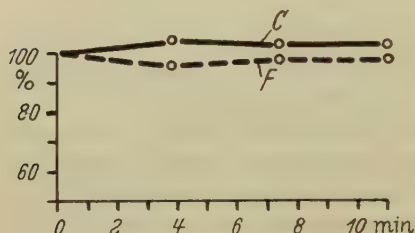


Abb. 1.

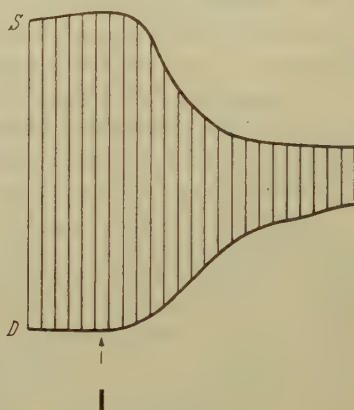
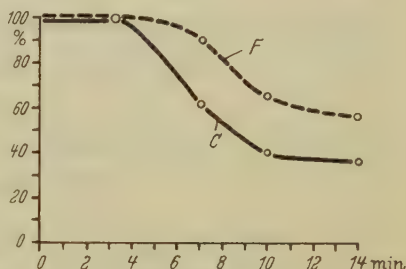


Abb. 2.

Abb. 1. Versuch vom 27. 1. 53. Herz eines 570 g schweren Meerschweinchens. Beim Pfeil $3 \cdot 10^{-7}$ dl- α -tokopherolphosphorestersäures Na. C Coronardurchfluß, F Herzfrequenz, unten Registrierung der Ventrikelkontraktionen. — Nach Tokopherol keine wesentliche Änderung von Coronarvolumen und Frequenz, jedoch mäßige positiv inotrope Wirkung.

Abb. 2. Gleiches Präparat wie in Abb. 1. Oben: Herzfrequenz (F) und Coronardurchfluß (C) in % der Ausgangswerte, unten: Ventrikelkontraktionen (S Systole, D Diastole). — Beim Pfeil $5 \cdot 10^{-6}$ dl- α -tokopherolphosphorestersäures Na: Abnahme von Frequenz und Coronardurchfluß und stark negativ inotroper Effekt.

II. Eindeutige Effekte traten bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ Tokopherol in der Durchströmungsflüssigkeit auf: Amplitude, Frequenz und coronares Durchflußvolumen wurden nun deutlich herabgesetzt und zwar in Abhängigkeit von der Größe der Dosis, um bei einer Dosis von $1 \cdot 10^{-5}$ in einer Mittelstellung zwischen Systole und Diastole (eher etwas mehr diastolisch) stehen zu bleiben; die Verkleinerung des Coronardurchflusses betrug dabei im Durchschnitt 70%. Eine weitere Abbildung

(Abb. 2) zeigt die geschilderten Einflüsse, die *negativ chronotrope* (-50%) und *inotrope* (-80%) *Wirkung* bei einer *Dosis* von $1 \cdot 10^{-6}$ *Tokopherol* sowie eine *Abnahme der Coronardurchströmung* (-60%).

Eine Zusammenstellung aller Versuche zeigt Tab. 1: Tokopherolwirkung am schlagenden Herzen.

Tabelle 1.

Konzentration	Coronardurchfluß	Herzfrequenz	Amplitude	Bemerkungen
$3 \cdot 10^{-7}$	0	0 ((+))	((+)) ((-))	unter RINGER nachfolgend Amplitude vergrößert
$5 \cdot 10^{-7}$	((+)) ((-))	((+)) ((-))	((+)) ((-))	
$1 \cdot 10^{-6}$	(-)	((-)) (-)	(-)	siehe oben, dabei Unregelmäßigkeit der Frequenz
$2 \cdot 10^{-6}$	—	(-)	—	
$5 \cdot 10^{-6}$	—	—	—	Reversibilität schlecht
$1 \cdot 10^{-5}$	— —	Herzstillstand		kaum reversibel

Zeichenerklärung: 0 kein Effekt; ((+)) Förderung, ((-)) Hemmung um 10% ; (+) Förderung, (-) Hemmung um $10-25\%$; + Förderung, — Hemmung um $25-50\%$; ++ Förderung, — — Hemmung um 50% .

(Jeder Bewertung liegen jeweils 10 Einzelwerte zugrunde.)

III. Bei geringeren Tokopherolkonzentrationen ist die Reversibilität gut, doch wird nach einer Dosis von $3 \cdot 10^{-6}$ die alte Durchflußmenge durch die Kranzgefäße nicht wieder erreicht. Diese Verkleinerung des Coronarvolumens nach Tokopherol ist wesentlich stärker als die geringe konstante Verminderung des Coronardurchflusses, die jedes Herz bei längerer Beobachtung zeigt (siehe ORZECOWSKY⁶). Bei höheren Konzentrationen erholen sich die Herzen aus der negativ inotropen Wirkung sehr schlecht, nach dem Herzstillstand kaum noch. Es läßt sich feststellen, daß eine Gabe von Adrenalin in einer Dosis von $1 \cdot 10^{-7}$ bei Zusatz kleiner Tokopherolmengen ($5 \cdot 10^{-7}$) einen stärkeren und länger anhaltenden positiv inotropen Effekt aufweist als ohne Tokopherol.

IV. Es erhebt sich nun die Frage, ob die Veränderungen von Amplitude und Frequenz unter Tokopherol durch Eigenwirkungen dieser Substanz zustande kommen oder vielleicht nur Folgeerscheinungen der Coronarverengung sind bzw. umgekehrt. Zum Studium der direkten Coronarwirkung des Tokopherol benutzten wir nichtschlagende Herzen, um so die durch die Tätigkeit des Muskels ausgelöste reaktive Beeinflussung der Gefäßweite auszuschließen. Der Herzstillstand wurde durch

O₂-Entzug hergestellt, wobei vorher natürlich Tokopherol nicht verabfolgt war.

Bei Beginn mit einer *Konzentration von* 1 bis $3 \cdot 10^{-7}$ zeigte sich nun eine Kontraktion der Coronargefäße, die dosisabhängig verstärkt wurde, wobei die Konzentrationen größenordnungsmäßig in demselben Bereich wie am schlagenden Herzen lagen. *Tokopherol* bewirkt demnach eine *direkte Konstriktion der Coronarien am stillstehenden Herzen*. Die folgende Tab. 2 gibt hierüber näheren Aufschluß.

Tabelle 2. *Tokopherolwirkung am stillstehenden Herzmuskel.*

Konzentration	$3 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Coronardurchfluß	(—)	—	— —

(Zeichenerklärung siehe Tab. 1.)

Vergleichen wir den Grad von Amplitudenverkleinerung und Frequenzverminderung mit dem der Coronardrosselung, so läßt sich ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ eine Parallelität erkennen, wie HOFFMANN und WIENKE² sie in ähnlicher Form als Folge experimenteller Coronardrosselung gefunden haben. Abweichend davon ist die relativ stärkere Beeinflussung der Kontraktionsgröße (siehe Abb. 2: Tokopherol in der Dosis von $5 \cdot 10^{-6}$ bewirkt eine Coronardrosselung um 60% und eine Amplitudenverkleinerung von 80%) und das Stillstehen des Herzens, wenn die Coronarien durch Tokopherol um 70% gedrosselt sind. Eine künstliche Durchflußverkleinerung von beispielsweise 60% hatte eine Minderung der Zuckungsamplitude von nur 65% und der Frequenz von nur 55% zur Folge². Daraus ist zu entnehmen, daß die stärkere Herabsetzung der Amplitude und die Herzstillstände, wie sie nach höheren Dosen von Tokopherol zustande kommen, eine zusätzliche *Beeinflussung der Herzmuskelzelle* bedeuten, eine negativ inotrope Wirkung, die über das Maß der entsprechenden Coronardrosselung hinausgeht.

Kleine Einzeldosen von Tokopherol (1 bis $5 \cdot 10^{-7}$) lassen am schlagenden Herzen keine coronarverengernde Wirkung zutage treten, vielmehr sind hierbei sogar positiv inotrope Effekte zu erhalten. Bei Wiederholungen dieser Dosen in kurzen zeitlichen Abständen macht sich jedoch infolge Kumulierung des Tokopherols wiederum die umgekehrte Wirkung bemerkbar. Diese dosisabhängige Beeinflussung von Dynamik und Durchblutung stellte VACCARI⁸ am isolierten Kaninchenherzen gleichfalls fest, während das isolierte Froschherz eine Leistungssteigerung und verlängerte Überlebenszeit aufwies (dl- α -Tokopherolacetat).

Werden die in den vorliegenden Versuchen angewendeten Konzentrationen des Tokopherol in der Therapie cardiovasculärer Krankheiten erreicht? Bei gleichmäßiger Verteilung auf das Gesamtgewebe des Organismus (oder nur auf das Blut) kann man eine maximale und minimale

Konzentration berechnen (HOFFMANN und KEMPE²), wobei der wirkliche Wert dazwischen liegt. Bei 300 mg Vitamin E (dl- α -Tokopherolacetat) würde bei einem 66 kg schweren Menschen die Konzentration bei intravenöser Injektion zwischen $4,5 \cdot 10^{-6}$ und $4,5 \cdot 10^{-5}$ liegen; da die Anflutung eines solchen öllöslichen Stoffs aus einem intramuskulären Depot langsamer ist, werden wir niedrigere Werte erhalten, doch dürften *diese Dosen noch sehr nahe bei denjenigen liegen, die einen negativ inotropen Effekt mit Coronardurchflußminderung* haben.

Zusammenfassung.

Am isolierten Meerschweinchenherzen wurde der Einfluß von dl- α -tokopherolphosphorestersaurem Natrium in verschiedener Dosierung geprüft. Es ergab sich:

1. bei einer Konzentration von 1 bis $5 \cdot 10^{-7}$ kam es zu einer positiv inotropen Wirkung ohne chronotropen Effekt und ohne Minderung der Coronardurchströmung;

2. bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ waren Zuckungsamplitude, Herzfrequenz und coronares Durchflußvolumen deutlich herabgesetzt, bei $1 \cdot 10^{-5}$ blieb das Herz in Mittelstellung stehen;

3. bei $5 \cdot 10^{-7}$ war eine Kumulation nacheinander verabfolgter Gaben nachweisbar;

4. am stillstehenden Herzen wurde stets eine Coronarkonstriktion auch schon durch kleine Tokopheroldosen deutlich.

Literatur.

- ¹ FREY, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **221**, 466 (1954). — ² HOFFMANN, G., u. H. WIENKE: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **217**, 225 (1953). — ³ HOFFMANN, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 193 (1953). — ⁴ HOFFMANN, G., u. D. KEMPE: Klin. Wschr. **1951**, 349. — ⁵ LANGENDORFF, O.: Pflügers Arch. **61**, 291 (1895). — ⁶ ORZECOWSKI, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **172**, 471 (1933). — ⁷ SHUTE, E., u. Mitarbeiter: Surg. etc. **86**, 1 (1948). — Lancet **254**, 301 (1948); **257**, 346 (1949); **2**, 840 (1951); **1**, 108 (1952); **1**, 717 (1952). — J. Obstetr. **58**, 842 (1951). — Brit. Med. J. **1**, 276 (1952). — ⁸ VACCARI, F.: Cuore **35** (1951).

Prof. Dr. med. JOACHIM FREY, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. med. LUDWIG HEILMEYER).

Über den Einfluß von dl- α -Tokopherol auf den fermentativen Phosphatstoffwechsel der Tubuluszellen der Rattenniere*.

Von

JOACHIM FREY.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 12. Dezember 1953.)

In einer vorausgegangenen Arbeit⁴ wurde gefunden, daß α -Tokopherolsubstanzen bei Mensch und Tier (Maus) Filtrationsdiuresen herbeiführen. Es konnte angenommen werden, daß es der antioxydative Effekt ist, der „als Eingriff in den Zellstoffwechsel“ den Reiz für die Auslösung von Filtrationsdiuresen abgibt (J. FREY⁵). Abb. 1 zeigt die Herabsetzung der Atmung von Rindenschnitten der Rattenniere nach Zusatz von 5 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaurem Natrium pro ml Suspensionsflüssigkeit (Kurvenmittel aus je 13 WARBURG-Versuchen). Die Leber dagegen macht mit einer Atmungssteigerung unter den untersuchten Körpergeweben eine Ausnahme. Es konnte nicht gesagt werden, ob der herabgesetzte O₂-Verbrauch durch Tokopherol Ausdruck einer direkten Atmungshemmung oder eines verminderten O₂-Bedarfs ist.

Da eine Zelleistung von der vorhandenen Menge des energiereichen Phosphats ($\sim$ Ph) abhängig ist¹¹ (vor allem Adenosintriphosphorsäure, ATP), wird demnach der Eliminierungsvorgang durch die Tubulusepithelien der Nieren von dem Entladungsvermögen und dem Vorrat der energiereichen Phosphatverbindungen des Adenylsäuresystems bedingt.

Des weiteren sind die Übertragungen der Phosphatgruppen von einer Substanz zur anderen (Transphosphorylierungen) an die Tätigkeit der Phosphoresterasen gebunden und die biologische Oxydation von Phosphorylierungen begleitet⁹, ohne „daß man vielleicht doch nicht ‚Atmung‘ mit oxydativer Phosphorylierung gleichsetzen darf“ (WEIL-MALHERBE¹⁶).

Wegen der Bedeutung des angeführten intermediären Phosphatmetabolismus für die Zelleistungen^{10, 3, 8} wurde die Aktivität der ATPase, der Phosphormonoesterasen, sowie der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) und Phosphokreatin und die Ammoniakbildung am Substrat der Niere unter Einwirkung von dl- α -tokopherolphosphorester-

* Prof. ERNST FREY zum 75. Geburtstag.

saurem Natrium bzw. dl- α -Tokopherolacetat (Tokopherol) untersucht, um einen teilweisen Einblick zu erhalten, in welcher Weise diese Stoffgruppe in den tubulären Zellstoffwechsel eingreifen kann.

Methoden. Die Ammoniakbestimmung wurde nach PARNAS¹³ ausgeführt, indem Schnitte von der Rinde erwachsener Ratten mit 50–140 mg Feuchtgewicht pro Ansatz verwendet wurden. Als Suspensionsflüssigkeit diente KREBS-RINGER-Lösung ohne Glucosezusatz, die Inkubationszeit betrug 60 min bei Sauerstoffzusatz und Hinzufügen von 1 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaurem Natrium, geschüttelt in sauerstoffbeschiedenen Gefäßen der WARBURG-Apparatur.

Die Phosphatase-Aktivität wurde unter Zusatz von β -Glycerophosphat nach dem Verfahren von BODANSKY² mittels Analyse des anorganischen Phosphats nach BERENBLUM und CHAIN¹, modifiziert von ROSEMUND¹⁵, bestimmt. Der Zusatz von tokopherolphosphorestersaurem Na hatte nur einen geringen Einfluß auf das freigesetzte Phosphat, wie eigene Bestimmungen hierzu ergaben. Das während der Inkubation aus tokopherolphosphorestersaurem Na freigesetzte Phosphat wurde als „Leerwert“ in Abzug gebracht; es ist bei kleinen Dosen Tokopherol nicht oder nur gering, bei größeren Dosen jedoch deutlich nachweisbar. Zur Homogenisierung wurden die Gesamtnieren von erwachsenen Ratten mit 0,05 g Feuchtgewicht pro Ansatz genommen. Zur Prüfung der sauren Phosphatase diente ein Acetatpuffer (pH 5,6), der alkalischen Phosphatase ein Glykokollpuffer (pH 9,0). Es wurde die gleiche Menge von Tokopherol (1 mg) hinzugefügt.

Die ATP-ase-Aktivität wurde mit dem Präparat $\text{Na}_2\text{H}_2\text{-ATP}$ der Zellulosefabrik Mannheim-Waldhof ermittelt. Bei diesen Bestimmungen wurde bei einem pH von 7,4 und pH 8,7 (Veronalpuffer) gearbeitet. Der Tokopherolzusatz war ebenso der gleiche wie die übrige Handhabung der Versuche. Da durch eigene Untersuchungen bekannt war, daß Veronal-Na (Medinal) eine Hemmung der O_2 -Atmung von Nierenschnitten herbeiführt^{5, 7}, wurde die ATP-ase-Aktivität bei verschiedenen Puffern geprüft. Bei Verwendung des Veronalpuffers (pH 8,7 und 9,0) war die Aktivität des untersuchten Ferments in der Tat niedriger als bei Anwendung eines Glykokollpuffers (pH 9,0). In Vorversuchen fand sich eine stärkere Beeinflussung der Fermentaktivität mit Glykokollpuffer als mit Veronalpuffer, jedoch war die prozentuale Änderung durch Tokopherolzusatz bei Berücksichtigung der verschiedenen

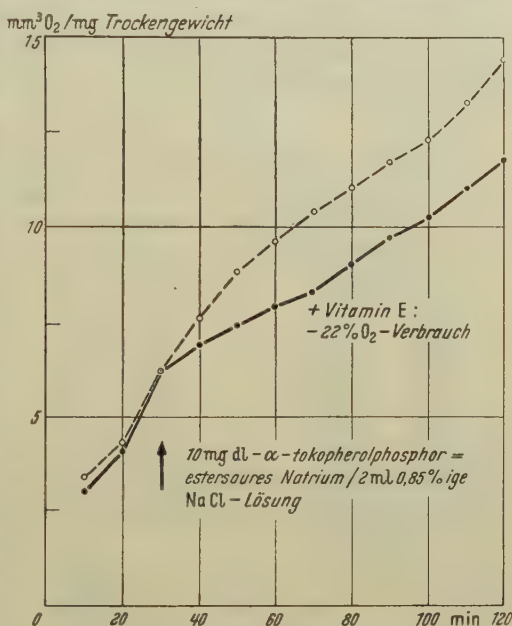


Abb. 1. Atmung von Nierenrindengewebe (Ratte) unter Einwirkung von Tokopherol-Hemmung des O_2 -Verbrauchs. Oben normale Atmung ($\text{QO}_2 = 9$), unten O_2 -Zehrung nach Vitamin E ($\text{QO}_2 = 7$). Je 13 Versuche.

Ausgangswerte gleich. Für die vorliegenden Versuche wurde jedoch auf die Verwendung des Glykokollpuffers verzichtet, um nicht für die Prüfung der ATP-ase-Aktivität zu sehr in das alkalische Gebiet zu kommen. Die Wahl des Puffers ist also für das empfindliche Nierengewebe nicht zu vernachlässigen; Veronalpuffer erniedrigt gegenüber Glykokollpuffer die ATP-ase-Aktivität um 10—20%.

Die Analyse des Phosphokreatins geschah nach dem Verfahren von LOHMANN¹², der Adenosintriphosphorsäure nach PIROWITZ u. GOHL¹⁴, wobei auch ADP mit-erfaßt wird.

I. Tab. 1 zeigt die spontane Ammoniakbildung in Rindenschnitten der Ratte (ohne Zusatz von Aminosäuren): während im Verlauf von 1 Std die Menge des Ammoniaks um + 50% zugenommen hat, bedingt ein Zusatz

Tabelle 1.

mg Ammoniak pro 100 g Feuchtgewicht Nierenrinde (Gewebschnitte) und Stunde.

vor Inkubation		nach Inkubation			
		ohne Tokopherol		mit Tokopherol 1 mg/2 ml	
3,39	8,96	7,26	10,80	3,87	9,45
3,39	8,96	7,26	10,80	3,63	9,56
4,08	4,00	4,95	4,84	4,08	4,12
4,08	4,00	4,95	9,31	4,40	5,33
7,98	4,24	9,68	5,93	8,71	5,04
7,98	4,24	9,68	6,05	8,46	5,04
7,26	4,24	12,70	7,02	9,08	4,84
7,26	4,24	10,80	7,02	7,86	4,84
3,27	4,12	6,05	6,76	4,84	4,84
3,27	4,12	6,05	6,76	4,84	4,96
Durchschnitt:					
5,15		7,73		5,89	
		+ 50%		+ 15%	
		P < 0,001		P < 0,02	
				> 0,01	

von 1 mg dl- α -tokopherolphosphorestersaurem Na pro 2 ml Suspensionsflüssigkeit eine Vermehrung von durchschnittlich nur + 15% (Versuche von Februar—März 1953).

Ob das Ammoniak aus den Adenylgruppen oder aus anderen Substanzen stammt, kann nicht gesagt werden. Die *desaminierende Aktivität der Nierenrinde wird durch Tokopherol erniedrigt*.

II. Auch die Aktivität der geweblichen alkalischen Phosphatase ist unter Tokopherolzusatz verkleinert, wie Tab. 2 darlegt.

Homogenat aus 1 g Feuchtgewicht Gesamtniere setzt im alkalischen Milieu (pH 9,0) pro Stunde im Durchschnitt von 45 Einzelversuchen aus einer organischen Phosphatverbindung (β -Glycerophosphat) 16,0 mg frei. Diese *Aktivität der alkalischen Phosphatase wird durch Zusatz von 1 mg α -Tokopherol gehemmt*: pro 1 g Feuchtgewicht und Stunde beträgt jetzt das anorganische Phosphat nur noch 10,9 mg, die Aktivität der alkali-

schen Phosphatase ist demnach um durchschnittlich 30% erniedrigt. Es darf daraus entnommen werden, daß die an die alkalische Phosphatase gebundenen Transphosphorylierungen verkleinert sind.

Tabelle 2.

mg anorganisches Phosphat, freigesetzt aus β -Glycerophosphat-Natrium durch 1 g Feuchtgewicht Niere (Homogenat) pro 1 Std — Aktivität der alkalischen Phosphatase bei p_H 9,0 (Vers. Januar—März 1953).

ohne Tokopherol					mit 1 mg Tokopherol				
8,0	25,0	26,2	16,4	21,1	5,0	17,0	16,0	10,7	16,6
10,0	11,3	15,0	16,4	16,6	7,6	4,8	7,5	12,0	11,5
10,0	10,0	17,5	16,4	16,6	7,3	6,3	7,5	10,5	11,5
15,0	12,5	15,0	11,5	16,6	10,8	6,5	10,0	7,3	12,1
14,6	10,3	15,0	11,8	16,6	10,0	3,0	11,2	7,7	11,5
13,0	12,6	22,4	11,7		9,8	6,9	17,5	7,8	
13,0	12,6	21,2	11,5		10,0	6,2	16,8	7,8	
13,7	12,6	22,7	21,2		9,5	6,5	17,5	16,6	
14,5	25,0	22,5	21,2		13,7	16,0	17,0	16,6	
12,5	25,0	16,4	21,2		11,2	15,7	7,7	16,6	

Durchschnitt:

16,0

10,9

$P < 0,001$ — 31%

Die Aktivität der sauren Phosphatase (p_H 5,6), unter gleichen Bedingungen untersucht, ist durch Tokopherol nicht herabgesetzt: statt 5,6 mg werden 5,5 mg anorganisches Phosphat freigesetzt. Dieser Unterschied in der Beeinflussung der Aktivität der beiden Phosphatasen ist bemerkenswert. Wir werden in anderem Zusammenhang hierauf zurückkommen.

III. Tab. 3 zeigt das Verhalten der ATP-ase-Aktivität (bei p_H 8,7) unter Tokopherolzusatz (1 mg/2 ml).

Tabelle 3. *mg anorganisches Phosphat, freigesetzt aus 4,2 mg ATP pro Ansatz durch 1 g Feuchtgewicht Gesamtniere (Homogenat) und Stunde.*

ohne Tokopherol	mit 1 mg Tokopherol
18,8	13,8
26,2	16,2
17,5	13,7
16,5	13,7
22,5	13,7

Durchschnitt:

20,3

14,2

$P < 0,02$

$> 0,01$ — 30%

Mit $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$ als Substrat werden pro 1 g Feuchtgewicht Gesamtniere (Homogenat) und 1 Std ohne Tokopherol 20,3 mg und mit Tokopherol 14,2 mg anorganisches Phosphat freigesetzt: die ATP-ase-Aktivität der Niere wird durch Tokopherol um 30% erniedrigt (bei p_H 8,7).

Untersucht man die Aktivität dieses Ferments bei p_H 7,4, so läßt sich nur eine geringe Verkleinerung derselben finden (— 2%).

IV. Um zu erfahren, ob die antioxydative Wirkung des α -Tokopherol zu einer Anhäufung von energiereichem Phosphat führt, das aber nicht zur Verfügung steht, weil die Aktivität der ATP-ase unter Vitamin E — wie gefunden — vermindert ist, wurden Adenosintriphosphat und Phosphokreatin im Nierenhomogenat analysiert, nachdem die Tiere (Ratten von durchschnittlich 130 g Gewicht) 4—5 Tage lang 3 mg oder 10 mg dl- α -Tokopherolacetat (Ephynal Roche) subcutan pro Kilogramm täglich erhalten hatten. Tab. 4 gibt die Resultate wieder (April—Mai 1953).

Tabelle 4.

Kontrollen	3 mg α -Tokopherol pro kg und Tag	10 mg α -Tokopherol pro kg und Tag
mg Adenosintriphosphat pro 100 g Feuchtgewicht Gesamtniere (Homogenat) nach 3 bzw. 10 mg dl- α -Tokopherolacetat pro Kilogramm und Tag gegenüber Kontrollen.		
11 Tiere	10 Tiere	8 Tiere
282 400	368 359	288 149
537 392	359 228	323 228
302 461	244 139	204 195
440 308	195 250	212
290 296	375 288	190
340		
Durchschnitt: 358 mg ATP/100 g	280 mg/100 g	216 mg/100 g
P < 0,05 > 0,02	— 21%	P < 0,001 — 40%
mg Phosphokreatin pro 100 g Feuchtgewicht Gesamtniere (Homogenat) nach dl- α -Tokopherolacetat gegenüber Kontrollen.		
14 Tiere	8 Tiere	10 Tiere
18,6 17,0	12,6 44,2	43,0 30,0
61,0 31,0	35,0 32,5	6,9 35,0
83,5 30,0	13,2 19,9	9,3 5,8
126,0 17,0	2,0 1,2	10,4 4,4
54,0 47,0		5,0 4,0
95,0 55,8		
69,5 7,4		
Durchschnitt: 50 mg/100 g	20 mg/100 g	15 mg/100 g
P < 0,1 > 0,05	— 60%	P < 0,01 > 0,001 — 70%

Auch die Konzentrationen an energiereichen Phosphatverbindungen, *Adenosintriphosphat* und *Phosphokreatin*, sind durch *Tokopherol* verkleinert worden, und zwar durch größere Dosen mehr als durch kleine.

V. Die vorliegenden Versuche zeigen, daß die Aktivität der alkalischen Phosphatase (p_H 9,0), die an den Transphosphorylierungen beteiligt ist, durch α -Tokopherol deutlich erniedrigt wird (—30%). Die ATP-ase-Aktivität (p_H 8,7) ist ebenfalls verkleinert (—30%).

Aus den Versuchen von VENTURA¹⁷ könnte man entnehmen, daß die Herabsetzung der Fermentaktivität zu einer Energieanreicherung unter Tokopherol führe, zumal Vitamin E den Glucosegehalt in Muskel, Herz und Nieren erhöhen und das Leberglykogen vermehren soll. Die Versuche zeigen jedoch, daß neben der Verkleinerung der Enzymaktivität (alkalische Phosphatase, Adenosintriphosphatase) auch eine solche der Substratkonzentrationen (ATP um 20—40%, Phosphagen um 60—70%) eingetreten ist; daß also die unter Tokopherol erfolgende Atmungshemmung eine Funktionseinschränkung der Tubuluszellen bedeutet als Ausdruck einer direkten Atmungshemmung. In diesem Sinne ist der Befund zu erklären, daß durch Tokopherol der sauerstoffzehrende Prozeß der Wasserausscheidung der Nieren nach oraler Wasserbelastung⁶ verringert wird⁴.

Sicherlich ist der oxydationshemmende Effekt des Tokopherol ein solcher Eingriff in den tubulären Zellstoffwechsel, daß hierdurch der Reiz für die Auslösung einer Filtrationsdiurese gegeben ist, wie es für andere Stoffe früher auseinandergesetzt wurde⁵. Da das Tokopherol primär ein gefäßkonstringierender Stoff ist⁴, muß seine gegenteilige Wirkung im Sinne der renalen Gefäßdilatation und damit der Filtrationsdiurese der Mitwirkung des Zellmetabolismus der Nierenepithelien selbst zugesprochen werden. Es wurde früher auseinandergesetzt⁷, daß diese dem Funktionszustand der Filtrationsdiurese zugehörige Gefäßweitenreaktion, die außerdem sichtbar gemacht werden kann⁶, dem intrarenalen Nervenplexus zugeschrieben wird, das die Teile (Tubulus-Glomerulus) der Funktionseinheit (Nephron) miteinander verbindet.

Zusammenfassung.

Durch Versuche in vitro und vivo wurde gefunden, daß durch dl- α -tokopherolphosphorestersaures Natrium bzw. dl- α -Tokopherolacetat

1. die spontane Ammoniakbildung von Nierenschnitten (Rinde) pro Stunde nur +15% (statt +50%) beträgt,
2. die Aktivität der alkalischen Phosphatase (p_H 9,0) von Nierenhomogenat um 30%,
3. die ATP-ase-Aktivität um 30% erniedrigt wird,
4. der Gehalt der Nieren an Adenosintriphosphat um 20—40%,
5. derjenige an Phosphokreatin um 60—70% abnimmt.

Diese Fermentbremsungen und Konzentrationsverringierungen an energiereichen Phosphatverbindungen stellen als Eingriff in die energieliefernden Prozesse der Tubuluszellen denjenigen Reiz dar, der eine Filtrationsdiurese auslöst.

Literatur.

- ¹ BERENBLUM, I., u. E. CHAIN: *Biochemie J.* **32**, 286, 295 (1938). — ² BODANSKY, M.: zit. nach MAUER: *Beitr. Klin. Tbk.* **106**, 421 (1952). — ³ FELIX, K.: *Naturwissenschaften* **40**, **44** (1953). — ⁴ FREY, J.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **221**, 466 (1954). — ⁵ FREY, J.: *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **58**, 200 (1952). — ⁶ FREY, J.: in E. u. J. FREY: *Die Funktionen der gesunden u. kranken Niere*, S. 73. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1950. — ⁷ FREY, J.: *Urologia (Ital.)* **6**, 461 (1952). — ⁸ HERBRAND, W., u. K. H. JÄGER: *Das Adenylsäuresystem*, Aulendorf: Editio Cantor 1952. — ⁹ KALCKAR, H. M.: *Enzymologia (Den Haag)* **2**, 47 (1937). — ¹⁰ LANG, K.: *Der intermd. Stoffwechsel*, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — ¹¹ LIPMANN, F.: zit. nach LANG. — ¹² LOHMANN, K.: *Biochem. Z.* **194**, 306 (1928) — in HINSBERG, K., u. K. LANG: *Medizin. Chemie*, S. 58. München-Berlin: Urban u. Schwarzenberg 1951. — ¹³ PARNAS, J. K.: in HINSBERG u. LANG: *Medizin. Chemie*, S. 519. München-Berlin: Urban u. Schwarzenberg 1951. — ¹⁴ PIROWITZ, J., u. D. GOHL.: in D. GOHL: *Quantitative Bestimmung von ATP und ADP in tierischen Organen*. Inaug.-Diss. Freiburg 1953. — ¹⁵ ROSEMUND: unveröff. (Med. chem. Labor Zürich). — ¹⁶ WEIL-MALHERBE, H.: *Die Chemie u. d. Stoffwechsel d. Nervengewebes*, S. 61. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — ¹⁷ VENTURA, L.: zit. nach HERBRAND u. JÄGER, S. 45.

Prof. Dr. med. JOACHIM FREY, Freiburg/Br., Med. Univ.-Klinik.

Med.-diagn. Institut d. Städt. Krankenanstalten Karlsruhe
(Chefarzt: Prof. Dr. med. W. RIECHERT).

Beeinflussung des Rattenpfotenödems und des Lungenödems nach doppelseitiger Vagotomie durch Mutterkornalkaloide, durch Narkose (Avertin) und deren Charakterisierung durch Trypanblau.

Von

WILLI RIECHERT und HERMANN BARGHORN.

(Eingegangen am 17. Dezember 1953.)

Nachdem eine Reihe von Arzneistoffen in ihrer Wirkung auf das Rattenpfotenödem studiert wurde^{2, 5, 10}, konnten RIECHERT und KLEIN⁶ den Befund erheben, daß nach Vorbehandlung mit Ergotamin, Dihydroergotamin (DHE) und Hydergin (CCK) das Hühnereiweißödem der Rattenpfote fast ausgelöscht werden kann. Während durch die Vorbehandlung mit diesen Pharmaka die Phase der reaktiven Hyperämie noch anläuft, wird die Oedemphase unterdrückt.

In solchen Untersuchungen wurde das Oedem bei jedem Versuchstier nur einmal mit Hühnereiweiß provoziert. Es ergab sich damit die Frage, wie oft man am gleichen Tier das Pfotenödem reproduzieren kann und ob sich der Grad der Oedembildung durch die mehrmalige Provokation ändert. Auch sollte bei mehrmaliger Provokation die Wirkung des DHE studiert werden.

Weiterhin sollte durch entsprechende Untersuchungen ermittelt werden, bei welcher Grenzkonzentration der angewandten Mutterkornalkaloide die oedemverhindernde Wirkung noch zum Ausdruck kommt. Es interessiert auch die Frage, ob durch mehrtägige Vorbehandlung mit den Mutterkornalkaloiden im Vergleich zum Effekt nach einmaliger Injektion die oedemverhindernde Wirkung stärker ausgeprägt ist.

Die Beurteilung des Oedemgrades in den Versuchen von RIECHERT und KLEIN erfolgte durch Inspektion. Um diese Beurteilung eindeutiger zu gestalten, wurde eine Versuchsreihe mit Trypanblau angestellt. Vom Trypanblau ist bekannt und durch eigene Beobachtungen bestätigt, daß es nach intraperitonealer Applikation über das Gefäßsystem in Organe wie Leber, Milz, Nieren und Darm eindringt, d. h. diese Organe blau anfärbt. Es wurde erwartet, daß im Vergleich zu entsprechenden Kontrolluntersuchungen die Rattenpfote mit Oedembildung sich schneller und intensiver anfärbt. Diese Untersuchungen wurden auch auf das Lungenödem nach doppelseitiger Vagotomie ausgedehnt.

Daß andere Oedemformen, z. B. das toxische Lungenoedem durch Narkotica in ihrem Verlauf beeinflußt werden können, wurde versucht, ob dieses für das Rattenpfoten-oedem zutrifft. Aus positiven Ergebnissen würde sich ein zentralnervöser Faktor für die periphere Oedembildung ergeben.

Ergebnisse der Versuche mit dem Rattenpfoten-oedem.

Methode der Hühnereiweiß-oedemprovokation an der Rattenpfote.

Die Versuche wurden an weißen Ratten durchgeführt. Die Injektion von Hühnereiweiß erfolgte subcutan an der volaren Seite einer Hinterpfote. In Kontrolluntersuchungen (48 Tiere) wurde beobachtet, daß sich jedes Mal nach der Provokation mit Hühnereiweiß ein Oedem entwickelte, die Methode also keinen Streuungswert aufweist und daß, zu gleicher Zeit beobachtet und verglichen, Art und Stärke des Oedems die gleichen waren. Die Beurteilung des Oedemgrades erfolgte jede 5 min in der 1. Std; jede 15 min in der 2. Std und dann halbstündlich mindestens über eine Zeit von 8 Std. War das Oedem zum Zeitpunkt von 8 Std noch deutlich ausgeprägt, so erfolgte eine Beurteilung nochmals nach 18 Std.

Während nach der ersten Hühnereiweißgabe sich in üblicher Weise ein Oedem an der Hinterpfote bildete, entwickelte sich nach der 2. Gabe am gleichen Tier das Oedem etwas schneller. Beim 3. Mal war der stärkste Grad des Oedem vorhanden, der bereits nach 15 min erreicht wurde und über 4 Std bestehen blieb. Bei weiterer Provokation bis zum 12. bzw. 13. Mal zeigte der jeweilige Oedemverlauf keinen Unterschied von dem entsprechender Kontrolltieren mit nur einmaliger Oedemprovokation. Auch konnte noch bei der 12. bzw. 13. Oedemprovokation ein oedemverhindernder Effekt des DHE festgestellt werden.

Die Versuche zur Ermittlung der wirksamen Grenzkonzentrationen wurden an 39 Ratten durchgeführt. Vom Ergotamin sind noch 0,5 mg/kg wirksam. Im Vergleich zu den Kontrolltieren flutet das Oedem bei dieser Konzentration langsamer an. 0,25 mg/kg zeigt keine Wirkung mehr. Die analogen Dosen vom Dihydroergotamin liegen bei 0,75 mg/kg., beim Hydergin bei 0,225 mg/kg.

In den Versuchen mit Trypanblau wurde dieses in einer 0,5%igen Lösung, 1 ml pro 100 g Ratte intraperitoneal appliziert. Bei den Kontrolltieren, bei denen keine Provokation mit Hühnereiweiß durchgeführt wurde, zeigte sich nach 1 Std eine geringe, allgemein livid aussehende Verfärbung an der Schnauze, den Ohren, den Augenlidern, den Konjunktivae, der Bauchdecke, auch an den Extremitäten, bei denen nur die Laufballen frei blieben, die nach 2 Std deutlicher wurde. Eine besonders intensive Verfärbung zeigte sich am Scrotum. Der Urin war nach kurzer Zeit rot gefärbt. Die Sektion ergab eine Blauanfärbung fast aller inneren Organe mit Ausnahme der Lungen.

Bei 8 Versuchstieren wurde in üblicher Weise das Hühnereiweiß-oedem hervorgerufen und zu bestimmten Zeiten das Trypanblau interperitoneal

injiziert und zwar bei einem Tier gleichzeitig mit der Eiweißgabe, bei 2 Tieren 30 min, bei einem Tier 40 min, bei einem Tier 50 min, bei 2 Tieren 60 min nach der Gabe von Hühnereiweiß. Das Pfotenödem entwickelte sich bei allen Tieren wie üblich. Das erste Tier zeigte schon nach 10 min eine beginnende Verfärbung des oedematösen Gewebes der Rattenpfote, nach 14 min war die Färbung deutlich blau, nach 17 min sehr stark blau angefärbt. Im weiteren Verlauf des Oedems war die Färbung noch stärker ausgeprägt. Die übrigen Ratten zeigten ebenfalls in der gleichen Zeit von 15—17 min nach der Hühnereiweißapplikation eine deutliche Verfärbung des oedematösen Gewebes. Die Oedempfoten zeigten im Vergleich zu den nicht mit Hühnereiweiß aber mit Trypanblau behandelten Pfoten auch eine Blaufärbung der Laufballen. Auch wenn mehrere Male das Oedem beim gleichen Tier provoziert wurde, so konnte die vorzeitige Blaufärbung durch Trypanblau der oedematösen Pfote beobachtet werden. Bei den letzten Tieren, die 60 min nach der Hühnereiweißgabe intraperitoneal Trypanblau bekamen, färbte sich das Oedem nicht mehr an. Erst nach 3 Std danach trat wie bei den Kontrolltieren eine allgemein livide Verfärbung auf.

Wurde vor der Oedemprovokation in der üblichen Weise DHE und zwar 6—8 mg/kg injiziert, so beobachteten wir, wie zu erwarten, eine wesentliche Milderung in der Stärke des Oedems. Es zeigte sich fernerhin, daß das injizierte Trypanblau das Oedem nicht anfärbte. Erwähnt sei noch, daß die livide Verfärbung der nur mit Trypanblau behandelten Ratten unter dem Einfluß von DHE stark verzögert wurde; und zwar trat diese nicht wie üblich nach 1—2 Std sondern erst nach 7—8 Std auf.

Das Triphenyltetrazoliumchlorid ist für die bessere Differenzierung der Oedemphasen nicht geeignet.

Die Epinephrektomie wurde in Avertinnarkose in üblicher Weise durchgeführt und darauf geachtet, daß bei der Exstirpation die obere Kappe der Nierenkapsel mit abgetragen wurde. Für den Zeitpunkt der Oedemprovokation war entscheidend, daß die Tiere eine deutliche Adynämie zeigten. Die Tiere lagen in diesem Zustand breitbeinig mit dem Körper auf der Tischplatte. Der Kot war feucht, breiig und schmierig. 6 von diesen operierten Tieren wurden am 5. Tage postoperativ mit Hühnereiweiß in der üblichen Weise behandelt. Eines dieser Tiere erhielt 30 min vor der Oedemprovokation 3,6 mg/kg DHE.

Bei den unvorbehandelten Tieren war ein schnelleres und stärkeres Anfluten des Oedems im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren ohne Epinephrektomie zu beobachten. Das Oedem war auch über eine längere Zeit bis zu 10 Std ausgeprägt. Auch nach 24 Std war noch eine entzündliche Reaktion an der mit Hühnereiweiß behandelten Pfote zu beobachten. Eines dieser Tiere, welches schon am 5. Tag nach der Operation ausgeprägte Zeichen der Nebenniereninsuffizienz im erwähnten Sinne bot, zeigte einen wesentlich schwächeren Ablauf des Oedems. Bei den mit DHE vorbehandelten epinephrektomierten Tier war lediglich ein mäßiges

Anfluten des Oedems zu beobachten. Das Rattenpfotenödem ließ sich auch bei epinephrektomierten Tieren 2 Tage nach der 1. Oedemprovokation mit der gleichen Stärke wiederholen.

In den Versuchen mit Avertin (1 ml der 3%igen Lösung pro 100 g Tier s. c.) erfolgte die Oedemprovokation während des Toleranzstadiums der Narkose. Hier wurde eine Verzögerung des Anflutens des Oedems über längere Zeit beobachtet. Das Oedem flutete aber bis zum stärksten Grad an, wenn die Narkose nachließ oder das Versuchstier sogar wach wurde. Wurde durch erneute Injektion von Avertin die Narkose vertieft, so ging auch das Oedem wieder um ein Geringes zurück. Dieser Wechsel war bei allen Versuchstieren zu beobachten. Wenn 3 Std nach Beginn der Narkose diese nicht mehr durch erneute Injektion von Avertin verlängert wurde, so bildete sich dann plötzlich ein starkes Oedem aus, wie es bei den nur mit Hühnereiweiß behandelten Kontrolltieren beobachtet wurde.

Versuche mit Trypanblau am Lungenödem nach doppelseitiger Vagotomie.

Method.

Die doppelseitige Vagotomie erfolgte in Avertinnarkose an Ratten. Nach erfolgter Vagotomie trat eine sofortige Verlangsamung der Atmung ein. Das Trypanblau wurde in der üblichen Weise 10 min, 15 min, 20 min und 25 min nach der Operation gegeben. Die Pharmaka DHE (8 mg/kg), CCK (2,4 mg/Ng) und Ergotamin (5 mg/kg) wurden wie üblich i. m. 15 und 40 min vor der Operation gegeben. Die operierten Tiere wurden bis zum Exitus oder bis zum Zeitpunkt der Tötung, etwa 3 Std laufend beobachtet und dann sezirt. Die Lungen wurden frei präpariert und Gewicht und Volumen ermittelt und das Gewicht der Lungen auf 100 g Tier bezogen.

Ergebnisse.

Diese Versuchsserie wurde an 26 Ratten durchgeführt. Zwei Tiere wurden als Kontrolltiere operiert und nicht mit Trypanblau behandelt. 11 Tiere wurden in der gleichen Weise operiert und erhielten Trypanblau, 6 Tiere Trypanblau und DHE, 2 Tiere Trypanblau und Ergotamin, 2 weitere Tiere Trypanblau und CCK. Tritt nach doppelseitiger Vagotomie ein Lungenödem auf, so färbt sich dieses mit Trypanblau mäßig an. Wenn durch die Gabe von DHE, Gynergen und CCK das Oedem verhindert wird, dann ist die Verfärbung der Lungen nicht deutlich zu beobachten.

Das toxische Adrenalin-Lungenödem, provoziert an 3 Versuchstieren war deutlicher als nach doppelseitiger Vagotomie mit Trypanblau angefärbt.

Besprechung der Versuchsergebnisse.

Zur Beurteilung der Unterdrückung der Oedemphasen durch die Mutterkornalkaloide kann man methodisch in verschiedener Weise vorgehen, und zwar 1. durch eine objektive Messung, 2. durch gewissenhafte Inspektion oder 3. mit Hilfe von

Farbstoffen den Grad des Oedems zu differenzieren. Nach unseren Erfahrungen scheint die objektive Messung des Oedems mit einer Millimeterlehre oder mit der Plethysmographie nicht geeignet zu sein, die sich schnell bildenden Gradverschiebungen genau festzulegen. Dieses ist aber besonders in der Zeit des Anflutens des Oedems bei unserer Fragestellung „Hyperämie oder seröse Phase“ unbedingt erforderlich.

Die Oedemgradbeurteilung durch Inspektion bietet den Vorteil der raschen Handhabung. Die Fehlerbreite dürfte nicht über der der objektiven Messung liegen. Es mußte rein empirisch ein Maß für die Beurteilung des Oedemgrades gefunden werden, worauf schon bei den Versuchsergebnissen hingewiesen wurde. Die reaktive Hyperämie ist identisch mit dem 1. Grad, die 2. seröse Phase teilten wir in den 2. und 3. Grad je nach Ausbreitung des Oedems ein.

Andere Autoren^{1, 4} addierten die Gradzahlen aller Versuchstiere und führten die ermittelten Zahlen durch Division der Anzahl der Versuchstiere auf eine angenommene Grundzahl von 10 Versuchstieren zurück. Die ermittelte Durchschnittszahl stellten sie zum Vergleich. Diese Art der Beurteilung scheint uns ungeeignet zu sein, da die durch die subjektive Inspektion bedingte Ungenauigkeit nicht noch durch eine Nivellierung erhöht werden sollte und zum anderen etwa gefundene Wirkungsdifferenzen unter gleichen Bedingungen in einem solchen Beurteilungssystem nicht mehr zum Ausdruck gebracht werden können. Uns kommt es darauf an, nicht Durchschnittsreaktionen aufzuzeigen, sondern das Einzelbild einer Reaktion zu erkennen und dessen Geschehen in die Diskussion einzubeziehen.

Die Versuchsergebnisse über die mehrmalige Provokation des Rattenpfotenödems durch Hühnereiweiß haben gezeigt, daß solche Versuche am gleichen Tier des öfteren immer mit dem gleichen Wirkungseffekt durchgeführt werden können. Auch die oedemverhindernde Wirkung der Mutterkornalkaloide kommt bei diesen wiederholten Prüfungen zum Ausdruck.

So konnten die Untersuchungen von RIECHERT und KLEIN bestätigt werden. Unabhängig davon, ob diese Mutterkornalkaloide eine gefäßkonstriktorische oder gefäßdilatatorische Wirkung hervorrufen, zeigen sie immer den gleichen Grundeffekt. Der Verlauf des Hühnereiweißödems ist sowohl durch die Vorbehandlung mit Gynergen als auch mit DHE und CCK milder. Der stärkste Oedemgrad wird nicht erreicht. Als Ursache für die oedembehindernde Wirkung der Mutterkornalkaloide sehen wir unabhängig von ihrer Gefäßwirkung ihre allgemeine sympatholytische Wirkung an. Die Mutterkornalkaloide wirken demnach im Sinne einer Permeabilitätsbehinderung im Bereich der entzündeten Rattenpfote (vgl. auch RIECHERT^{7, 8}). Das Ergotamin und das CCK am Rattenpfotenodem wirken in der gleichen Größenordnung, während das DHE für den gleichen Wirkungseffekt etwas höher dosiert werden muß.

Zusammenfassend darf man sagen, daß die Mutterkornalkaloide nicht die 1. Phase, d. h. die reaktive Hyperämie, sondern bei den angewandten Konzentrationen die seröse Phase des Hühnereiweiß-Rattenpfotenödems beeinflussen (vgl. auch RIECHERT und KLEIN S. 489).

Mit Trypanblau konnte die grundsätzliche Beobachtung gemacht werden, daß bei den Kontrolltieren sich nach 2 Std eine livide Blaufärbung der Gewebe an der Pfote, Schnauze, Scrotum usw. und bei der Sektion eine Blaufärbung aller inneren Organe mit Ausnahme der Lungen zeigte. Da während des sehr schnellen Anflutens des Oedems der Rattenpfote nach Gabe von Hühnereiweiß die Capillarepithelien für Flüssigkeit durchlässig werden, so erscheint es nicht überraschend, daß ein in dieser Zeit im Blut kreisender Farbstoff (Trypanblau) verstärkt in das oedematöse Gewebe einläuft. Dieser Befund wurde schon von HALPERN³ erhoben, der von uns vollauf bestätigt werden konnte. Wichtig erscheint der Befund, daß während der Phase der reaktiven Hyperämie d. h. in den ersten 5—10 min ein Einlaufen des Farbstoffes nicht beobachtet werden konnte. Die Blaufärbung zeigt damit den Beginn der serösen Phase an. Man kann daher mit dem Trypanblau die 1. von der 2. Oedemphase differenzieren. Jedoch ist eine bessere Differenzierung zwischen dem 2. und 3. Grad der 2. Phase nicht möglich. Entscheidend für die Beurteilung der Oedemphasen durch die Blaufärbung ist der Zeitpunkt, zu dem das Trypanblau injiziert wird. Wird der Farbstoff erst auf der Höhe der Oedembildung gegeben, so läuft das Trypanblau nicht früher in das entzündliche Gewebe der Pfote ein als bei den Kontrolltieren, bei denen kein Pfotenodem provoziert wurde. Somit scheint nur während des Anflutens des Oedems eine erhöhte Permeabilität des Gefäßsystems zu bestehen.

Wenn nun das Rattenpfotenodem durch Mutterkornalkaloide im Verlauf reduziert wurde, so tritt die Blaufärbung der Rattenpfote später ein. Die Verzögerung der Blaufärbung der Rattenpfote mit Trypanblau durch die Mutterkornalkaloide kommt auch dann sehr deutlich zum Ausdruck, wenn nicht mit Hühnereiweiß behandelte Ratten mit Mutterkornalkaloiden vorbehandelt werden. Die normalerweise nach 1—2 Std auftretende allgemeine Blaufärbung wird auf weitere 3—5 Std hinausgezögert. Die Sektion in solchen Versuchen zeigte, daß dieser Effekt nicht etwa durch eine Resorptionsminderung des Trypanblaus von der Bauchhöhle her durch Mutterkornalkaloide bedingt ist, sondern daß die Mutterkornalkaloide das Anfluten des Oedems zu verhindern und damit die allgemeine livide Verfärbung zu verzögern vermögen. Dies scheint an einer Schutzwirkung der gesamten Peripherie durch die Mutterkornalkaloide gegen ein rasches Permeieren des Farbstoffes zu liegen. Ein anderer Mechanismus als die Wirkung auf die Capillaren im Sinne einer verminderten Durchlässigkeit durch die Mutterkornalkaloide kann ausgeschlossen werden.

Unsere Versuche mit Avertin und dem Hühnereiweißbrattenpfotenodem machen es wahrscheinlich, daß auch die periphere Oedembildung von einem zentralen Faktor abhängig ist, ganz ähnlich wie es die Untersuchungen am Lungenodem gezeigt haben. Unerwartet zeigte sich der

Befund, daß nach Gabe von Avertin die Phase der reaktiven Hyperämie wohl regelrecht abläuft, die zweite Oedemphase jedoch verzögert beginnt und sich erst mit dem Nachlassen der Narkosetiefe deutlich ausbildet. Es handelt sich hier nicht um eine Unterdrückung des Oedems, sondern nur um eine zeitliche Verschiebung.

Bei der Untersuchung der Wirkung der Mutterkornalkaloide auf das Pfotenödem nach beiderseitiger Epinephrektomie muß größter Wert auf die Ausschaltung anderer die Oedembehinderung oder die Lebensdauer der Tiere begünstigender Effekte gelegt werden.

Nach SCHULTZER⁹ geben die meisten Autoren eine Mortalität nach der Operation von 80—100% an. Als mittlere Überlebensdauer nach der doppelseitigen Epinephrektomie werden 5—6 Tage angegeben. Eine höhere Lebensdauer spricht für ein Zurückbleiben von Resten von Nebennierengewebe, welche außerhalb des Organs in der Nierenkapsel verstreut liegen können. Deshalb fordert SCHULTZER bei der Epinephrektomie die zusätzliche Dekapsulation der Niere, mit der er eine Mortalität von 100% erzielte. Der Höhepunkt der Insuffizienzerscheinungen liegt nach seinen Erfahrungen zwischen dem 5. und 6. Tag. Die bis zum 8. Tag noch überlebenden Tiere liegen bereits im Sterben.

Will man also das Verhalten nebennierenloser Tiere auf die Oedemprovokation unter der Einwirkung der Mutterkornalkaloide bzw. anderer Pharmaka studieren, so muß dieses in der Zeit vom 5. —7. Tag nach der Operation erfolgen.

Unsere Versuchsergebnisse zeigen, daß bei epinephrektomierten Tieren das Rattenpfotenödem stark ausgebildet ist und daß das DHE unter dieser Bedingung nicht mehr so intensiv wirkt. Die Hormone der Nebennierenrinde hemmen ja den Ablauf entzündlicher Reaktionen, auch am Hühnereiweißrattenpfotenödem.

Zusammenfassung.

1. Das Ödem an der Rattenpfote läßt sich am gleichen Versuchstier durch mehrmalige Provokation mit Hühnereiweiß immer in der gleichen Stärke hervorrufen.

2. Die noch gerade wirksamen Dosen für die Beeinflussung des Hühnereiweißödems im Sinne eines abgeschwächten Verlaufes liegen beim Ergotamin bei 0,5 mg/kg, beim Dihydroergotamin bei 0,75 mg/kg und beim „Hydergin“ bei 0,225 mg/kg.

Die besprochene Wirkung der Mutterkornalkaloide wird als ein sympathicolytischer Effekt aufgefaßt, wodurch ein Schutz gegen das Permeieren von Flüssigkeit und Farbstoffen aus den Gefäßen in das Gewebe hervorgerufen wird.

3. Trypanblau i. p. injiziert (0,5% ige Lösung, 1 ml pro 100 g Tier) erlaubt eine bessere Differenzierung zwischen der 1. und 2. Oedemphase. Durch die Vorbehandlung mit Dihydroergotamin bei nur mit Trypanblau behandelten Kontrolltieren wird die allgemeine livide Verfärbung der

Tiere wesentlich hinausgezögert, ebenso ist die Blaufärbung des Hühner-eiweißrattenpfotenödems kaum zu beobachten.

4. Die zeitliche Verzögerung des Hühner-eiweißödems der Rattenpfote durch die Vorbehandlung mit Narkotica (Avertin) macht einen zentralen Faktor für die Regulation des Verlaufes des peripheren Oedems wahrscheinlich. Auch bei epinephrektomierten Tieren wirkt das Dihydroergotamin im genannten Sinne, wenn auch nicht so intensiv auf das Hühner-eiweißoedem. Hierdurch kommt der Einfluß der Nebennierenrinden-Hormone auf den Verlauf der Entzündung zum Ausdruck.

Literatur.

- ¹ FREY, J., u. R. FISCHER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 392 (1951). —
² GROSS, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **211**, 421 (1950). — ³ HALPERN, B. N.,
 u. M. BRIOT: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 247 (1950). — ⁴ HEILMEYER, L.,
 J. FREY u. R. FISCHER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 387 (1951). —
⁵ JACQUES, R., u. R. DOMENJOZ: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 124 (1950).
 — ⁶ RIECHERT, W., u. H. KLEIN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 425 (1950).
 — ⁷ RIECHERT, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 321 (1951). — ⁸ RIECHERT,
 W.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **213**, 82 (1951). — ⁹ SCHULTZER, P.: J. of
 Physiol. Cambridge Univ. Press. **84**, 1 (1935). — ¹⁰ WILHELMI, G., u. R. DOMENJOZ:
 Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **212**, 421 (1950).

Prof. Dr. WILLI RIECHERT,
 Med.-diagn. Institut d. Städt. Krankenanstalten Karlsruhe.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Professor Dr. F. JUNG) und der Pharmakologischen Abteilung des Instituts für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften.

Über Stoffwechselleistungen von roten Blutkörperchen.

I. Kationentransport und Methämoglobinrückbildung.

Von

HANSJÜRGEN MATTHIES.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Dezember 1953.)

Bekanntlich variieren die Zellen einer Blutprobe sowohl in bezug auf den Methämoglobin(Hb(3))-Gehalt, als auch auf ihr osmotisches Verhalten. Der Anstieg des normalen Methämoglobins geht ferner oft mit einer Verringerung der osmotischen Resistenz einher. Dafür sprechen Versuche von JUNG^{1, 2}, insbesondere aber auch klinische Beobachtungen von MOSER (zitiert bei JUNG³), der feststellen konnte, daß bei Patienten mit hämolytischem Ikterus bereits geringgradige Methämoglobinbildung hämolytische Krisen auslösen kann. Überhaupt ist Methämoglobinämie sehr oft von einer Hämolyse begleitet.

Diese Befunde lassen eine Beziehung zwischen Methämoglobingehalt und osmotischem Zustand der Erythrocyten vermuten. Doch können die Zusammenhänge nicht einfacher Art sein, denn die bloße Umwandlung des Hämoglobins in Methämoglobin in der Zelle erniedrigt die osmotische Resistenz nicht wesentlich (JUNG³). Vielmehr scheint es so zu sein, als ob erst im Verlauf der Methämoglobinrückbildung die Resistenzverminderung auftritt. Es liegt daher nahe, die Ursache für den Resistenzverlust in den Stoffwechselvorgängen zu suchen, die mit der Methämoglobinreduktion verbunden sind.

Den Ausgangspunkt für unsere Überlegungen bildeten Arbeiten von HARRIS, MAIZELS, PONDER¹⁻⁶ über den aktiven Kationentransport und den prolytischen Kaliumverlust der Erythrocyten, sowie von KIESE¹⁻³ über die Methämoglobinrückbildung in roten Blutkörperchen. Man kann danach von der Vorstellung ausgehen, daß der Kationentransport und die Methämoglobinreduktion in den Zellen um gleiche Stoffwechselsysteme konkurrieren und der eine Vorgang nur auf Kosten des anderen verstärkt werden kann. Zur experimentellen Überprüfung dieser Annahme wurden die Verhältnisse der Methämoglobinrückbildung unter veränderten osmotischen Bedingungen sowie der Ablauf des aktiven

Kationentransportes und die Erhaltung der normalen Kationenverhältnisse im Erythrocyten in Methämoglobin-Gegenwart und -Abwesenheit untersucht.

Methodik.

Als Versuchsobjekt wurden zumeist Kaninchenerythrocyten gewählt. Diese zeigen eine sehr schnelle Methämoglobinrückbildung und verfügen zudem über einen sehr aktiven Kationentransport, da ihr Kaliumgehalt verhältnismäßig hoch ist. Das Blut für einen Versuch wurde 4–6 Tieren durch Herzpunktion in Äthernarkose entnommen und durch Natriumcitrat ungerinnbar gemacht. Dieses Blut wurde 10 min. bei 3000 U/min zentrifugiert und anschließend das Plasma und die Leukocyten abgehoben. Die so erhaltenen Zellen wurden durchmischt, um die durch das Zentrifugieren erfolgte Fraktionierung zu beseitigen; dann wurden sie in zwei gleiche Ansätze geteilt. Der eine wurde mit 2,4% NaNO_2 , der andere mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1 versetzt, gründlich durchmischt und 5 min stehen gelassen. Danach erfolgte dreimaliges Zentrifugieren und Waschen beider Ansätze. Eine Mischung von 0,9% NaCl und isotonem Natriumphosphat-Puffer vom pH 7,3 im Verhältnis 9:1 diente als Waschflüssigkeit und, wenn nicht anders angegeben, auch als Suspensionsmedium für die Zellen im Versuch. Das Zellvolumen wurde in allen Fällen mittels Hämatokrit bestimmt und auf 40–50% eingestellt. Glucose wurde in einer Endkonzentration von 500 mg%, Lactat in einer solchen von 230 mg% als Substrat benutzt. Die Kontrollen erhielten an Stelle der Substratlösung das gleiche Volumen Suspensionsflüssigkeit zugesetzt. Sofort anschließend kamen die Ansätze, die sich unter Zimmerluft in weithalsigen ERLÉNMEYER-Kolben befanden, in einen Thermostaten und wurden bei 37° C 50 mal je min geschüttelt. — Je nach Versuchsdauer wurden halbstündlich oder stündlich Proben 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert und dann das Überstehende vorsichtig entfernt. Mit einer Blutzuckerpipette wurden 0,2 ml Zellen entnommen und mit destilliertem Wasser 1:100 hämolysiert. Die Bestimmung des Natriums und Kaliums erfolgte mit dem Flammenphotometer Modell III der Firma „VEB Optik Carl Zeiß Jena“. Die Bestimmung des Methämoglobins und Gesamthämoglobins wurde colorimetrisch nach HAYEMANN, JUNG u. v. ISSEKUTZ² am gleichen Hämolysat durchgeführt. Bei den Versuchen in hypertonem Medium wurde die Methämoglobinrückbildung manometrisch nach WARBURG gemessen.

Der flammenphotometrisch gemessene Natrium- und Kaliumwert wurde mit Hilfe des Hämatokrits oder des Gesamthämoglobins auf den Ausgangswert bezogen, um die Konzentrationsänderung durch Wasserverschiebungen zu korrigieren. Unter unseren Versuchsbedingungen zeigten sich aber keine nennenswerten Abweichungen des korrigierten Wertes vom gemessenen Wert.

Ergebnisse.

I. Versuche unter verschiedenen osmotischen Verhältnissen.

Zunächst sollte festgestellt werden, inwieweit sich eine außergewöhnliche Inanspruchnahme der Transportvorgänge auf die Methämoglobinrückbildung auswirkt. Eine derartige Belastung kann z. B. dadurch erzielt werden, daß man die Konzentrationsunterschiede zwischen Zellinnerem und dem Medium vergrößert. Dies wurde erreicht, indem in einer Reihe von Versuchen die Zellen nach der Behandlung mit Nitrit in hypertone NaCl -Lösung gebracht wurden. Die Abb. 1 zeigt die Ergebnisse eines

solchen Versuchs an *menschlichen* Erythrocyten. Als Medium diente 0,9%ige, 2,0%ige oder 2,5%ige ungepufferte NaCl-Lösung. Substratzusatz erfolgte nicht. Die Kurvenzüge geben den Ablauf der Methämoglobinerückbildung wieder, die Säulen zeigen das Zellvolumen am Schluß eines jeden Versuches in Prozenten des Anfangsvolumens. Die Methämoglobinerückbildung in 2,5%iger NaCl ist um 30% niedriger als in 0,9%iger NaCl unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Gleichzeitig ist eine Verminderung des Zellvolumens um fast 20% zu beobachten, was bei einem durchschnittlichen Wassergehalt der Erythrocyten von 63,9% (PONDER⁵) eine Verminderung des Lösungsraumes um 31% bedeutet.

II. Kationentransport in normalen und methämoglobinhaltigen Erythrocyten.

In weiteren Versuchen wurde der Kationentransport bei normalen und methämoglobinführenden Zellen verglichen. Als Stoffwechselsubstrate für Rückbildung und Ionentransport wurden Glucose und Lactat angeboten. Der Kationentransport wurde an der Fähigkeit der Zellen zur Erhaltung ihres normalen Ionenbestands beurteilt. Das Milieu enthielt in unseren Versuchen nur Na-Ionen, so daß ein ständiger K-Verlust und Na-Eintritt zu erwarten war. Durch den Stoffwechsel wird dieser wieder je nach dessen Intensität ausgeglichen, im Idealfall sollte der Ionenbestand der Zelle konstant bleiben. In Abb. 2 wird ein typischer Einzelversuch wiedergegeben. Die Ausgangskonzentrationen der beiden Ionen betragen 120 mval/l K und 26 mval/l Na, dargestellt sind nur die Verschiebungen.

Aus der Abb. 2 wird deutlich, daß bei normalen Zellen im Verlauf von 6 Std keine bedeutenden Verschiebungen eintreten. Am geringsten ist die Verschiebung unter Verwendung von Glucose als Substrat. Dieses Ergebnis entspricht nicht ganz den Befunden früherer Untersucher, jedoch muß beachtet werden, daß unsere Versuche an frischen Zellen durchgeführt wurden, welche reichliche Mengen eines noch unbekannten und nicht diffusiblen Stoffwechselsubstrats enthalten. Dieses vermag sowohl die Methämoglobinerückbildung wie den Ionentransport zu erhalten.

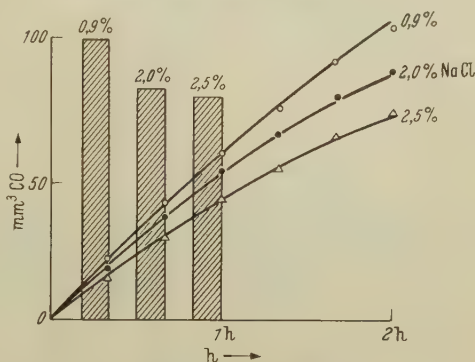


Abb. 1. Methämoglobinerückbildung in Abwesenheit von Substrat an Zellen, welche in hypertonen Medien suspendiert sind. (Menschliche Zellen, Zellkonzentration 40%.) Die Säulen stellen das Zellvolumen zu Versuchsende in % des ursprünglichen Volumens dar. Abscisse: Zeit in Stunden. Ordinate: Methämoglobinerückbildung, an der aufgenommenen CO-Menge bestimmt.

Bei methämoglobinführenden Zellen setzt sofort eine schnelle Na-Aufnahme ein; diese ist bei Versuchen ohne Substrat kontinuierlich, bei Verwendung von Lactat als Substrat fast von derselben Größenordnung, hört aber nach Ende der Methämoglobin-Reduktion (nach der 4. Std) auf; bei Verwendung von Glucose als Substrat ist sie deutlich vermindert,

sie hört ebenso wie bei Verwendung von Lactat nach Ende der Methämoglobin-Reduktion auf. Wird den Zellen gleichzeitig Lactat und Glucose angeboten, so sind die Unterschiede der Transportvorgänge zwischen normalen und methämoglobinführenden Zellen praktisch aufgehoben.

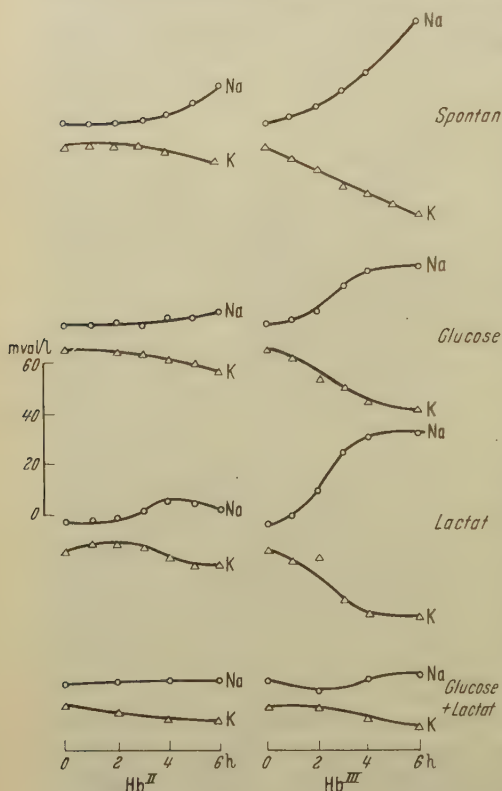


Abb. 2. Kationentransport in normalen und methämoglobinführenden Kaninchenblutkörperchen. Abszisse: Zeit in Stunden. Ordinate: Änderung des Na^+ - bzw. K^+ -Gehalts der Zellen gegenüber dem Ausgangswert.

normalen Zellen hervortreten, sollen noch eingehender untersucht werden.

III. Kationentransport bei gestörter Methämoglobinreduktion.

Die Ergebnisse der vorigen Versuche bestärkten uns in der Annahme, daß die Methämoglobinerückbildung und der Kationentransport teilweise vom gleichen Stoffwechselsystem abhängig sind. Zur weiteren Klärung dieser Frage gingen wir davon aus, daß bei Störung der die Methämoglobinreduktion unterhaltenden Stoffwechselvorgänge auch eine Störung der Transportvorgänge auftreten muß. Wir hatten bei Untersuchungen

der Rückbildung des Methämoglobins in roten Blutkörperchen festgestellt, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen auch bei Glucosezusatz die Zellen nicht mehr zur Reduktion des Methämoglobins fähig sind. Wenn man die gewaschenen Erythrocyten vor Präparation der Ansätze 16 Std bei 4° aufbewahrt und Glucose vor Einbringen in den Thermostaten zugibt, setzt die Rückbildung wie üblich ein, der Kationen-

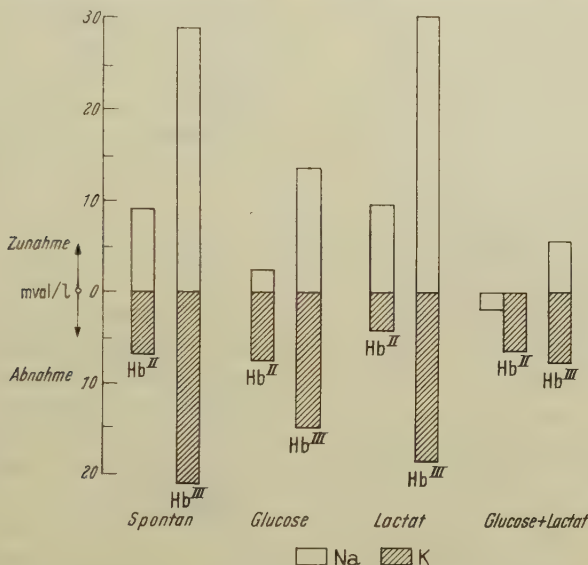


Abb. 3. Kationentransport in normalen und methämoglobinbildenden Kaninchenblutkörperchen. Mittelwerte aus 38 Versuchen (vgl. Abb. 2), jeweils 6 Std nach Beginn der Inkubation. Schraffierte Säulen: K⁺-Bewegung; unschraffierte Säulen: Na⁺-Bewegung.

bestand bleibt weitgehend erhalten, die Transportvorgänge sind also intakt. Wird die Glucose 1 Std nach Einbringen in den Thermostaten oder noch später zugesetzt, bleibt die Methämoglobinerückbildung unbedeutend. Der Kaliumverlust und die Natriumaufnahme zeigen hohe Werte, ein Zeichen dafür, daß der aktive Transport erheblich gestört ist (Abb. 4). Auch diese Erscheinung muß noch eingehender untersucht werden.

Diskussion.

Die Methämoglobinerückbildung in roten Blutkörperchen ist nach KIESE auf drei verschiedene Weisen möglich. Der eine Weg geht über Milchsäure, eine Milchsäuredehydrase und einen noch fraglichen Dehydrase-Accelerator und ist von der Glykolyse weitgehend unabhängig. Ferner kann Glucose die Reduktion des Methämoglobins bewirken, und zwar nach seiner Veresterung mit Phosphorsäure als Glucose-6-Phosphat über ein Co-Ferment und Zwischenferment (WARBURG, KUBOWITZ u.

CHRISTIAN), und eine Hämoglobinreduktase (KIESE), schließlich aber auch über ein Triosephosphat und ein beschleunigendes Ferment. Andererseits haben HARRIS und MAIZELS gezeigt, daß zur Erhaltung des aktiven Kationentransportes Glucose und Fructose, aber nicht Lactat

und Pyruvat dienen können. Diese Feststellungen, zusammen mit den Ergebnissen unserer Versuche, lassen unsere anfängliche Annahme von den Beziehungen zwischen der Methämoglobinrückbildung und dem Kationentransport als richtig erscheinen.

A.

Zweifellos bedeutet eine 2,5% NaCl-Lösung als Außenmedium eine starke Belastung für den aktiven Transport, denn die Konzentrationsgefälle von Natrium und Kalium zwischen dem Zellinneren und der Umgebung sind noch steiler, als sie es schon unter physiologischen Bedingungen sind. Die erhöhte Inanspruchnahme des angenommenen gemeinsamen Stoffwechselsystems durch die gesteigerten Transportvorgänge führt zu einer verminderten Bereitstellung von Substrat für die Methämoglobinreduktion, was sich in einer Verminderung der Reduktionsgeschwindigkeit äußert. Das vermehrte Auftreten von hemmenden Stoffwechselprodukten — etwa von Pyruvat — halten wir für

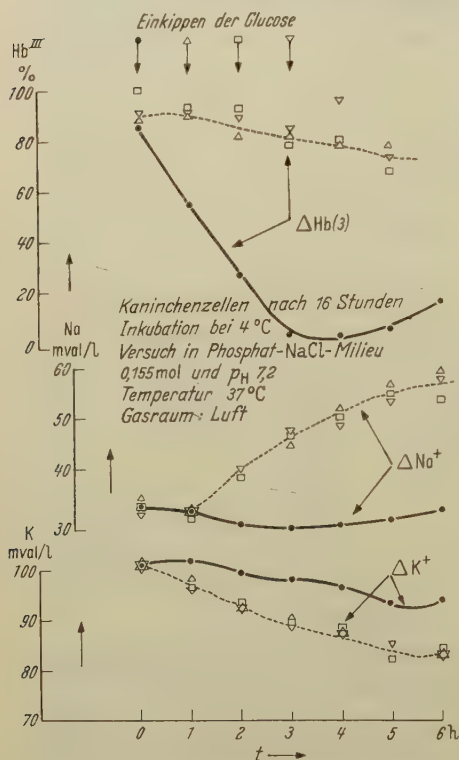


Abb. 4. Kationentransport und Methämoglobinrückbildung. Abscisse: Zeit in Stunden. Ordinate: Oben Methämoglobinreduktion: $\Delta Hb(3)$; Mitte Na^+ -Einwanderung: ΔNa^+ ; Unten K^+ -Auswanderung: ΔK^+ . —●—●— Kurve bei sofortiger Zugabe von Glucose. Kurve bei Glucosezugabe zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubationsbeginn. -- Δ -- Δ -- nach 1 Std.; -- $\square$ -- $\square$ -- nach 2 Std.; -- ∇ -- ∇ -- nach 3 Std.

unwahrscheinlich. Denkbar wäre allerdings auch, daß die Einengung des Lösungsraumes in den Zellen um 30% unter den gegebenen Bedingungen störend auf den normalen Ablauf der Methämoglobinreduktion einwirkt.

B.

Die Tatsache, daß die Methämoglobinreduktion durch zwei verschiedene Substrate auf unabhängige Weise beschleunigt werden kann, von denen nur das eine auf die Transportvorgänge fördernd einwirkt, gibt

uns die Möglichkeit in die Hand, neben der Feststellung der Abhängigkeit beider Vorgänge voneinander später auch die gemeinsamen Stoffwechselsysteme näher zu bestimmen. Aus den Versuchen, wie sie Abb. 2 darstellt, kann man folgendes schließen: Die Beanspruchung des Stoffwechsels in den roten Blutzellen durch die Erzeugung von Hb(3) hat zur Folge, daß ihr Kationenbestand infolge der Störung der Transportvorgänge nicht erhalten werden kann. Es kommt zu einer Natriumaufnahme und einem Kaliumverlust. Glucose, die sowohl Rückbildung als Transport fördert, wird bei gleichzeitigem Ablauf beider Vorgänge den Transport nur in geringem Ausmaß, die Rückbildung hingegen stark unterstützen. Anscheinend hat die Methämoglobinrückbildung unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei der Konkurrenz um das gemeinsame Stoffwechselsystem den Vorrang. Lactat, das nur auf die Rückbildung Einfluß nehmen dürfte, führt in der Tat zu keiner Verstärkung der Transportprozesse. Der Kaliumverlust ist in der gleichen Größenordnung wie bei den Kontrollen ohne Substrat. Die Rückbildung zeigt — wie erwartet — eine stärkere Beschleunigung als durch Glucose. Den stärksten Beweis für die Richtigkeit der gemachten Annahmen stellen die Befunde bei gleichzeitiger Zugabe von Glucose und Lactat dar. Dadurch, daß die Methämoglobinreduktion durch Lactat unterstützt wird, stehen die Stoffwechselsysteme mit Glucose als Substrat weitgehend dem aktiven Transport zur Verfügung. Die Folge davon ist, daß der Kationenbestand auch der methämoglobinhaltigen Zellen erhalten bleibt.

C.

Abb. 4 zeigt deutlich, daß die durch die besonderen Versuchsbedingungen erzielte Störung im Zellstoffwechsel sich sowohl auf die Hb(3)-Rückbildung, als auch auf den Kationentransport auswirkt. Wie andere Versuche zeigten, bleibt die Lactatreduktion auch dann noch weitgehend erhalten, wenn die Rückbildung durch Glucose schon erheblich gestört ist. (Die veränderten Versuchsbedingungen sind auch die Ursache der etwas andersartigen Na- und K-Kurven.) Eine Erklärung für das Verhalten der Erythrocyten in diesen Versuchen kann noch nicht gegeben werden.

D.

Aus den vorliegenden Versuchen geht die Bestätigung der anfangs aufgestellten Arbeitshypothese hervor. Es konnte eine enge Verbindung des aktiven Kationentransports und der Methämoglobinrückbildung, soweit sie durch Glucose verursacht wird, festgestellt werden. Es scheint weiterhin sicher zu sein, daß bei der Konkurrenz beider Vorgänge um die gleichen Stoffwechselsysteme in normalem osmotischem Milieu die Methämoglobinrückbildung den Vorrang vor dem aktiven Kationen-

transport besitzt. Das heißt also, daß die Zelle bei ablaufender Methämoglobinrückbildung in einen Zustand gerät, der der prolytischen Phase PONDERS ähnlich ist. Durch diese Beobachtungen werden auch die Befunde von JUNG, die eingangs erwähnt wurden, verständlich. JUNG konnte feststellen, daß die im Blut befindlichen alten Erythrocyten, die sich durch eine geringe osmotische Resistenz auszeichnen, einen höheren Gehalt an „normalem“ Methämoglobin aufweisen, als die jüngeren, osmotisch resistenteren Zellen der gleichen Blutprobe. Man kann also annehmen, daß mit zunehmendem Alter die Fermentsysteme der roten Blutkörperchen weniger leistungsfähig werden. Auch für die Beobachtung von MOSER, daß bei hämolytischem Ikterus die Erythrocyten besonders empfindlich gegen Methämoglobinbildner sind, und schon geringe Methämoglobinbildung zu hämolytischen Krisen führt, kann durch die vorliegenden Versuchsergebnisse eine Erklärung gegeben werden. Wahrscheinlich sind in den Zellen bei hämolytischem Ikterus die Fermentsysteme qualitativ oder quantitativ so ungenügend, daß gewissermaßen die prolytische Phase permanent ist. Geringste Überbelastungen, sei es durch die Notwendigkeit verstärkter Methämoglobinrückbildung, sei es durch Änderungen des osmotischen Milieus (welche an den Kationentransport-Mechanismus höhere Anforderungen stellen), führen zum Zusammenbruch des Kationenstatus und damit auch zur Hämolyse.

Zusammenfassung.

Es wurden die Beziehungen zwischen dem aktiven Kationentransport und der Methämoglobinrückbildung in roten Blutkörperchen untersucht. Daraus ergaben sich folgende Feststellungen:

1. Glucose unterhält beide Vorgänge, die Rückbildung hat in normalem osmotischem Milieu den Vorrang. — Verlieren die Erythrocyten die Fähigkeit, Methämoglobin zurückzubilden, ist auch die Erhaltung des Kationenbestandes der Zellen nicht mehr gesichert.

2. Lactat unterhält nur die Methämoglobinrückbildung.

3. Gleichzeitige Zugabe von Glucose und Lactat vermag sowohl die Hb(3)-Rückbildung, als auch den aktiven Kationentransport zu unterhalten.

4. Die Methämoglobinrückbildung in hypertonem Medium ist deutlich verlangsamt, die Ursachen dafür sind noch nicht geklärt.

5. Es bestehen Unterschiede im osmotischen Verhalten normaler und methämoglobinhaltiger Erythrocyten; sie haben ihre Ursache in der Konkurrenz der Methämoglobinrückbildung und des aktiven Kationentransports um gleiche Stoffwechselsysteme und führen dazu, daß die Methämoglobinrückbildung mit einem Absinken der osmotischen Resistenz verbunden sein kann.

Literatur.

- HARRIS, J. M.: J. of Biol. Chem. **141**, 747 (1938). — HAVEMANN, JUNG u. v. ISSEKUTZ: Biochem. Z. **301**, 116 (1939). — JUNG, F.: (1) Klin. Wschr. **1940**, 1016. — (2) Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **54**, Kongr. 1948. — (3) Naturwissenschaften **37**, 254 (1950). — KIESE, M.: (1) Biochem. Z. **316**, 264 (1944). — (2) Klin. Wschr. **1946**, 81. — KIESE, M., u. W. SCHWARTZKOPFF: (3) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 267 (1947). — KIESE, M.: (4) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 288 (1947). — MAIZELS, M.: J. of Physiol. **112**, 59 (1951). — PONDER, E.: (1) J. Gen. Physiol. **30**, 235 (1947). — (2) J. Gen. Physiol. **30**, 379 (1947). — (3) J. Gen. Physiol. **30**, 479 (1947). — (4) J. Gen. Physiol. **32**, 53 (1948). — (5) J. Gen. Physiol. **33**, 745 (1950). — (6) Hemolysis and related Phenomena, New York 1948. — SZEKELY, MANYAI u. STRAUB: Acta physiol. (Budapest) **4**, 31 (1953). — WARBURG, KUBOWITZ u. CHRISTIAN: Biochem. Z. **227**, 245 (1930).

Dr. HANSJÜRGEN MATTHIES,

Institut f. Pharmakologie u. Toxikologie d. Humboldt-Universität Berlin.

Aus den Pharmakologischen Instituten der Universitäten Rostock u. Frankfurt a. M.

Zur Frage der Methylierung des Nor-adrenalins im Organismus*.

Von

A. ENGELHARDT, K. GREEFF, P. HOLTZ und RENATE v. LUECKEN**.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Dezember 1953.)

Die Forschung der letzten Jahre hat zu der Erkenntnis geführt, daß bei der Erregung sympathischer Nerven vornehmlich Nor-adrenalin (Arterenol) als chemischer Überträger der Nervenwirkung frei wird. Im Einklang hiermit steht, daß die sympathicomimetische Wirksamkeit von Extrakten aus sympathischen *Nerven* und sympathisch innervierten Organen ganz überwiegend durch Arterenol und nur zu einem geringen Bruchteil durch Adrenalin bedingt ist. Demgegenüber enthält das *Nebennierenmark* der meisten Tierarten und des Menschen mehr Adrenalin als Arterenol, und die bei Splanchnicusreizung erfolgende Hormonsekretion besteht überwiegend aus Adrenalin. Bei einer länger dauernden sekretorischen Beanspruchung des Nebennierenmarks z. B. durch hohe Insulindosen oder — wie wir in einer vorausgegangenen Arbeit zeigen konnten (ENGELHARDT und GREEFF) — durch die Pique kommt es zu einer Verschiebung des ursprünglichen Mengenverhältnisses der beiden Hormone zugunsten des Arterenols. Die Umwandlung der „Vorstufe“ Nor-adrenalin zu Adrenalin, der eine Methylierung zugrunde liegt, hält dann offensichtlich nicht Schritt mit der Adrenalinabgabe, so daß die „Vorstufe“ sich anhäuft und auch an Stelle des methylierten Hormons sezerniert wird.

In einer früheren Arbeit haben wir darauf hingewiesen (HOLTZ, ENGELHARDT, GREEFF u. SCHÜMANN), daß dem *Acetylcholin*, — das bei der Erregung sympathischer Nerven im sympathischen Ganglion bzw. im Nebennierenmark frei wird und im einen Fall die Freisetzung von Nor-adrenalin, im anderen die von Adrenalin veranlaßt, — daneben die Funktion zukommen könnte, mit Hilfe seiner Methylgruppen eine Methylierung von Nor-adrenalin zu Adrenalin zu ermöglichen. Der hierzu erforderliche räumliche Kontakt zwischen dem „Methyldonator“ Acetylcholin und dem zu methylierenden Nor-adrenalin wäre im Nebennierenmark gegeben, nicht aber im sympathischen Nerven, da hier „Methyldonator“ und „Methylacceptor“ durch die Länge der postganglionären Nervenstrecke voneinander getrennt sind.

* Die Ergebnisse konnten aus äußeren Gründen erst jetzt veröffentlicht werden. Die ihnen zugrundeliegenden Untersuchungen wurden noch im Rostocker Institut durchgeführt.

** Herrn Prof. KARL THOMAS in Göttingen zum 70. Geburtstag.

Andererseits sind die Nebennieren sicher nicht die einzigen Organe, in denen Methylierungen stattfinden — es sei nur auf die Kreatinbildung im Muskel hingewiesen — und Acetylcholin und Cholin nicht die einzigen in Frage kommenden Methylendonatoren. Es besteht deshalb zumindest prinzipiell die Möglichkeit, daß auch das an den sympathischen Nervenenden bei der Erregung freiwerdende Nor-adrenalin im innervierten Organ zu einem mehr oder weniger großen Anteil — entsprechend der Methylierungsfähigkeit des betreffenden Organs — zu Adrenalin methyliert wird und als solches zur Wirkung gelangt. Wir haben deshalb schon seit mehreren Jahren immer wieder versucht, in Homogenaten und Extrakten aus verschiedenen Organen z. B. Herzmuskel, Milz, Leber durch Zusatz von Cholin und Methionin als Methylendonatoren und ATP als Katalysator eine Methylierung zugesetzten Nor-adrenalins nachzuweisen, bisher aber ohne eindeutiges positives Ergebnis. Ferner haben wir versucht, durch Untersuchungen an Testobjekten, die wie z. B. der Meerschweinchendarm und Kaninchenuterus stärker auf Adrenalin als auf Arterenol ansprechen, eine Methylierung wahrscheinlich zu machen, indem wir Arterenol allein, sodann die gleiche Arterenoldosis kombiniert mit einem Methylendonor, z. B. Methionin einwirken ließen. Obwohl wir mit dieser Versuchsanordnung häufig positive Ergebnisse, d. h. deutliche Wirkungsverstärkungen erhielten, haben wir die Untersuchungen bisher nicht veröffentlicht, da uns eine Deutung der Ergebnisse im Sinne einer stattgefundenen Methylierung von Nor-adrenalin zu Adrenalin zu gewagt erschien; denn wir erhielten ähnliche Wirkungsverstärkungen auch dann, wenn wir *Adrenalin* — das zu erwartende Methylierungsprodukt — mit dem Methylendonor kombinierten.

In letzter Zeit erschienene Arbeiten von FORST und DEININGER, sowie von GIERTZ und SCHILD über eine Verstärkung der pupillenerweiternden und blutzuckersteigernden Wirkung des Nor-adrenalins durch Methylendonatoren und die Deutung dieser Wirkungsverstärkung im Sinne einer Methylierung geben uns Veranlassung, über unsere früheren Untersuchungen sowie über die Ergebnisse einer Nachprüfung und Erweiterung der von den erwähnten Autoren ausgeführten Versuche zu berichten.

Versuche.

1. Der Einfluß von Methionin auf die Darm- und Uteruswirkung des Nor-adrenalins und Adrenalins.

In Übereinstimmung damit, daß die inhibitorischen Wirkungen beim Adrenalin im allgemeinen stärker sind als beim Nor-adrenalin, wirkt auch am Meerschweinchendarm Adrenalin etwas stärker hemmend als Nor-adrenalin. Die Unterschiede sind aber nicht groß.

In dem Versuch der Abb. 1A wird die darmhemmende Wirkung von 0,2 γ l-Arterenol durch 400 γ Methionin deutlich verstärkt. Diese

Verstärkung ist so groß, daß die darmhemmende Wirkung des Arterenols jetzt stärker ist als die Wirkung der entsprechenden Adrenalindosis. Schon dadurch wird unwahrscheinlich, daß der Mechanismus der Verstärkerwirkung des Methionins in einer *Methylierung* von Arterenol zu Adrenalin besteht. Das wird noch unwahrscheinlicher dadurch, daß auch die Adrenalinwirkung durch Methionin verstärkt wird und zwar in einem Ausmaß, daß die z. B. mit $0,2 \gamma$ Adrenalin + 200γ Methionin erzielte Tonussenkung stärker ist als diejenige, die man selbst mit der doppelten

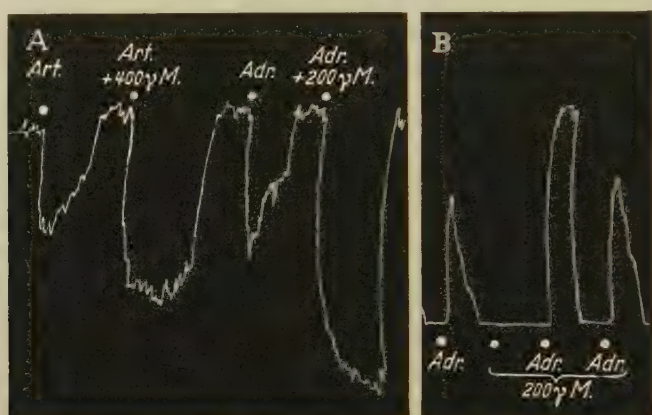


Abb. 1. Verstärkung der Adrenalin- und Arterenolwirkung durch Methionin an isolierten Organen. A Meerschweinchenrektum in 20 cm^3 Tyrode. Art. = $0,2 \gamma$ l-Arterenol; Adr. = $0,2 \gamma$ l-Adrenalin; M. = dl-Methionin. B Kaninchenuterus. Adr. = 1γ l-Adrenalin. Vor der 3. Adrenalingabe Badwechsel ohne Methioninzusatz.

Adrenalindosis erhalten würde. Methionin hat in den angewandten Dosen keine Eigenwirkung am Darm. Um seine Verstärkerwirkung zu zeigen, ist es nicht erforderlich, Methionin und Sympathicusstoff als Mischspritze zu verabfolgen; läßt man Methionin 1—2 min auf den Darm einwirken, so reagiert er auf eine jetzt erfolgende Injektion von Adrenalin oder Nor-adrenalin viel stärker als vorher. — Auch am *Kaninchenuterus* ließ sich in mehreren Versuchen, wenn auch nicht regelmäßig, die hier erregende Wirkung der beiden Sympathicusstoffe mit Methionin verstärken (Abb. 1 B).

Bei einer Wiederholung dieser Versuche ließen sich die Ergebnisse in den Monaten Juni und Juli regelmäßig reproduzieren, während das in der späteren Jahreszeit (Oktober) nicht mehr gelang. Die Vermutung, daß dieser jahreszeitliche Unterschied durch die Ernährungsumstellung von Grünfutter auf Körnerfutter bedingt sei, fand eine Bestätigung durch Versuche im November, in denen die Tiere mehrere Tage lang Grünfutterzulagen zum Körnerfutter erhielten. Am isolierten Darm dieser Tiere wurde die Hemmungswirkung sowohl des Arterenols als des Adrenalins durch Methionin wieder regelmäßig verstärkt. Das Ergebnis dieser

Versuche wirft Licht auf den mutmaßlichen *Mechanismus* der Methioninwirkung. Wenn wir annehmen, daß bei der Ernährung mit Grünfutter reichlich Oxydationsfermente — Phenolasen, Polyphenolasen — zugeführt werden, so fände die arterenol- und adrenalinverstärkende Wirkung des Methionins ihre zwangloseste Erklärung in einem durch Methionin ausgeübten *Oxydationsschutz* für die beiden Polyphenolderivate, der ja auch die Ursache für die adrenalinverstärkende Wirkung z. B. der Ascorbinsäure ist (KREITMAIR).

Die oxydationshemmende Wirkung des Methionins läßt sich zeigen, wenn man Adrenalin bzw. Nor-adrenalin mit Leberextrakten (Aminooxydase) oder Blutserum, in dem kürzlich das Vorkommen einer Polyphenol-oxydase nachgewiesen wurde (HORNYKIEWICZ und NIEBAUER), inkubiert und in bestimmten Zeitabständen den Adrenalin- bzw. Nor-adrenalin-gehalt der methioninfreien und methioninhaltigen Ansätze miteinander vergleicht. So fand sich beispielsweise in einem Versuch mit Extrakten aus Meerschweinchenleber bei Zusatz von Methionin nach 70 min 40%, nach 180 min 130% mehr unzerstörtes Adrenalin als in den methioninfreien Ansätzen.

2. Versuche an der Nickhaut mit „Methyldonatoren“.

Die Nickhaut des Katzenauges reagiert auf Adrenalin viel empfindlicher als auf Arterenol. Injiziert man die gleiche submaximal wirksame Arterenoldosis das eine Mal allein, das andere Mal zusammen mit einem „Methyldonator“ z. B. Methionin, so reagiert die Nickhaut im letzten Fall mit einer deutlich stärkeren Kontraktion. Auch hier läge es deshalb nahe, die Verstärkung durch Methionin im Sinne einer Methylierung schwächer wirksamen Arterenols zu wirksamerem Adrenalin zu deuten. Aber auch hier wäre diese Deutung wahrscheinlich unrichtig, da wir 1. gleichartige Verstärkungen der Arterenolwirkung durch Methionin auch an der *denervierten* Nickhaut erhielten, die mindestens ebenso empfindlich, meistens sogar etwas empfindlicher auf Arterenol als auf Adrenalin anspricht; 2. auch die durch *Adrenalin* verursachte Nickhautkontraktion bei gleichzeitiger Injektion von Methionin verstärkt fanden, wie das die Abb. 2A zeigt.

Wie am Darm und Uterus, so ließe sich wohl auch in diesen Versuchen an der Nickhaut die sich sowohl auf Arterenol als auf Adrenalin erstreckende Verstärkerwirkung des Methionins am plausibelsten damit erklären, daß Methionin die oxydative Inaktivierung der beiden Amine hemmt. Diese Erklärung würde dann allerdings nicht für die synergistische Wirkung zweier anderer „Methyldonatoren“, des Cholins und Acetylcholins zutreffen.

Injiziert man eine bestimmte Arterenol- oder Adrenalin-dosis zusammen mit einer an der Nickhaut unterschwelligsten Dosis von *Cholin* oder

Acetylcholin, so kommt es zu einer verstärkten Nickhautkontraktion (Abb. 2 B u. C). Hier dürfte es sich um einen „pharmakodynamischen“ Synergismus handeln, da durch Untersuchungen von ROSENBLUETH sowie von LISSAK und MARTIN bekannt ist, daß die Nickhaut, obwohl sie als rein „adrenergisches“ Effektororgan gilt, auch auf Acetylcholin bei höherer Dosierung (25—50 γ) sich kontrahiert. Der in unseren Versuchen beobachtete Verstärkereffekt auch an sich unerschwelliger Acetyl-

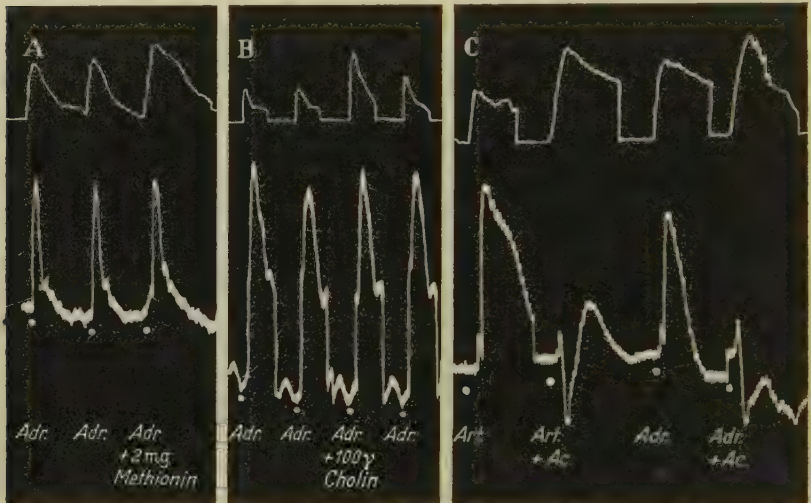


Abb. 2. Verstärkung der Nickhautwirkung von Adrenalin und Arterenol durch Methionin, Cholin und Acetylcholin. Obere Kurve: Nickhaut. Untere Kurve: Blutdruck. *A* Katze, 3,4 kg, Pernoclonarkose, Nickhaut 10 Tage vor dem Versuch denerviert durch Extirpation des Ganglion cervicale superius. Adr. = 3 γ l-Adrenalin. *B* Katze, 2,2 kg, Nickhaut nicht denerviert. Adr. = 8 γ l-Adrenalin. *C* Katze, 2,4 kg, 7 mg/kg Cocainhydrochlorid i. m. Art. = 5 γ l-Arterenol; Adr. = 5 γ l-Adrenalin; Ac. = 4 γ Acetylcholin.

cholin- und Cholidosen findet eine Parallele in der schon früher von uns mitgeteilten Beobachtung, daß am isolierten Uterus Prolan-vorbehandelter Meerschweinchen eine unerschwellige Arterenoldosis die Acetylcholininkontraktion um das Mehrfache verstärkt (GREEFF und HOLTZ).

3. Blutzuckerversuche.

Der von SCHÜMANN in unserem Institut an Kaninchen gefundene große Unterschied der *glykaemischen* Wirksamkeit von Adrenalin und Arterenol — l-Adrenalin ist ungefähr 10mal wirksamer als l-Arterenol — hatte uns als erster Test zur Differenzierung zwischen den beiden Aminen und zum Nachweis von Arterenol im Nebennierenmark gedient. Dieses Testes bedienten sich dann, wie erwähnt, GIERTZ und SCHILD zum Nachweis einer im Organismus stattfindenden Methylierung von Arterenol, indem sie bei Kaninchen einmal Arterenol allein, sodann die gleiche

Dosis mit Methionin („Thiomedon-Homburg“) intravenös injiziert. Die im zweiten Fall stärkere Blutzuckersteigerung deuteten sie im Sinne einer Methylierung des Arterenols zu Adrenalin. Kontrollversuche mit Adrenalin + Methionin wurden, soweit aus der Arbeit zu ersehen ist, nicht gemacht. Wir haben die Ergebnisse nachgeprüft und durch Versuche mit Adrenalin erweitert.

Methodik: 2–3 kg schwere Kaninchen, die 14 Std ohne Nahrung gelassen wurden. Blutzucker-Doppelbestimmungen nach HAGEDORN-JENSEN 5, 10, 20 und 30 min nach intravenöser Injektion von *l*-Arterenol, *l*-Adrenalin, *dl*-Methionin („Thiomedon-Homburg“) und Gemischen. Diese enthielten stets 30 mg/kg Thiomedon und wechselnd 6 γ , 10 γ oder 20 γ /kg Arterenol bzw. Adrenalin. 30 mg/kg Methionin war an sich ohne nachweisbare Blutzuckerwirkung. Das injizierte Flüssigkeitsvolumen betrug in allen Versuchen 0,75 cm³/kg. — Um individuelle Schwankungen möglichst auszuschalten, wurden „Überkreuzversuche“ gemacht, indem am gleichen Tier das eine Mal zuerst Arterenol bzw. Adrenalin und 2–3 Std später das Gemisch mit Methionin, das andere Mal in umgekehrter Reihenfolge injiziert wurde.

Die Ergebnisse sind in der Abb. 3 kurvenmäßig dargestellt. Die Kurven entsprechen Mittelwerten aus je 5 Versuchen und geben die Blutzuckersteigerungen in % des Nüchternblutzuckers an. — Durch Methionin wird nicht nur die Blutzuckerwirkung des *Arterenols*, sondern auch die des *Adrenalins* verstärkt. Diese Wirkungsverstärkung durch die gleiche Methionindosis ist in den Versuchen mit der *kleinsten* Arterenol- bzw. Adrenalinosis (6 γ /kg) am deutlichsten, mit 10 γ /kg schwächer und ließ sich bei der Injektion von 20 γ /kg (nicht abgebildet) nicht mehr nachweisen. Wenn somit unsere Befunde die Versuchsergebnisse von GIERTZ und SCHILD mit Arterenol und Methionin bestätigen, so macht unser darüber hinausgehender Befund einer Verstärkung der glykämischen *Adrenalin*wirkung durch Methionin die von den Autoren gegebene Deutung im Sinne einer Methylierung des Arterenols zu Adrenalin unwahrscheinlich.

4. Versuche an der denervierten Mäusepupille.

Es ist bekannt, daß die *mydriatische* Wirkung des Adrenalins stärker als diejenige des Arterenols ist. Aus Versuchen an Mäusen, in denen die

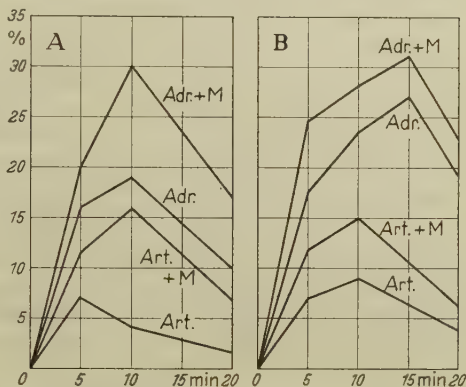


Abb. 3. Der Einfluß von Methionin auf die blutzuckersteigernde Wirkung von Adrenalin und Arterenol (Mittelwert aus je 5 Versuchen). Ordinate: Blutzuckeranstieg in % des Ausgangswertes. Abszisse: Minuten nach Injektion. A 6 γ /kg; B 10 γ /kg *l*-Adrenalin bzw. *l*-Arterenol. M = 30 mg/kg *dl*-Methionin („Thiomedon“).

mydriatische Wirkung intravenös injizierten Arterenols bei gleichzeitiger Injektion von Stoffen, die als Methylgruppenlieferanten in Frage kommen — Methionin, Cholin, Acetylcholin —, eine Verstärkung erfuhr, zogen FORST und DEININGER den Schluß, daß die Verstärkung der Arterenolwirkung durch eine Methylierung zu Adrenalin verursacht sei. Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse unserer Untersuchungen am gleichen Testobjekt sollen zeigen, daß dieser Schluß auch hier nicht zwingend ist.

Methodisch hielten wir uns im wesentlichen an die Angaben der Autoren. Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

Albinomäusen im Gewicht von 15—25 g wurde 14 Tage vor Versuchsbeginn in Äthernarkose das rechte Ganglion cervicale craniale entfernt. Der Hautschnitt wurde vom unteren Ohr rand caudalwärts geführt. Nach Freilegung des M. sternocleidomastoideus wurde dieser an seinem oberen Ansatz abgetrennt und nach unten geschlagen. Hierauf wurde unter Verwendung einer Lupenbrille die Arteria carotis in Höhe der Teilungsstelle frei präpariert, vom Nervus vagus getrennt und das unter der Teilungsstelle liegende Ganglion entfernt.

Die Injektionen erfolgten in die Schwanzvene. 1, 2, 5 und 10 min nach der Injektion wurde die Weite der rechten Pupille mit Hilfe eines Lupenmikroskopes mit Okularmikrometer bei 25facher Vergrößerung bestimmt. Als Beleuchtung diente eine 25 Watt-Birne. Zwischen den Ablesungen saßen die Tiere in dunklen Einzelkäfigen. Das Ausmaß der Pupillenerweiterung wird als Quotient aus dem nach der Injektion abgelesenen Wert und dem Ausgangswert angegeben:

$$Q = \frac{\text{Pupillenweite}}{\text{Pupillenweite vor der Injektion.}}$$

An jedem Versuchstier wurde die Wirkung von Arterenol bzw. Adrenalin allein und in Kombination mit einem „Methyldonator“ untersucht. Die Hälfte der Tiere erhielt im 1. Versuch nur das betr. Sympathicomimeticum, im 2. Versuch das Gemisch; bei der anderen Hälfte wurden die Injektionen in umgekehrter Reihenfolge verabfolgt. Der zeitliche Abstand zwischen dem 1. und 2. Versuch betrug 24 Std. Kontrollversuche hatten ergeben, daß eine nach 2 Std wiederholte zweite Injektion der gleichen Adrenalin- oder Arterenoldosis eine stärkere Mydriasis hervorrief als bei der ersten Injektion.

Den Befund von FORST und DEININGER, daß die nach *Nor-adrenalin* (Arterenol) auftretende Mydriasis an der denervierten Mäusepupille sich durch gleichzeitige Injektion von Methionin und Cholin verstärken läßt, können wir bestätigen. Aus den in der Abb. 4a dargestellten Versuchsergebnissen geht aber hervor, daß auch die *Adrenalin*mydriasis durch die gleichen „Methyldonatoren“ deutlich verstärkt wird. Wie am Darm und Uterus, am Blutzucker und an der Nickhaut, so erstreckt sich also auch an der Mäusepupille die fördernde Wirkung der „Methyldonatoren“ sowohl auf das nicht methylierte als auf das schon methylierte Brenzkatechinderivat.

Auch mit *Acetylcholin* erhalten wir eine Verstärkung der Adrenalin- und Arterenolmydriasis (Abb. 4b). Diese Verstärkung durch Acetylcholin steht in scheinbarem Gegensatz zu dem Befund von FORST und

DEININGER, daß die mydriatische Wirkung des *Adrenalins* durch Acetylcholin abgeschwächt wird. Die gegensätzlichen Befunde dürften ihre Erklärung darin finden, daß die von den beiden Autoren in diesen Versuchen angewandten Adrenalin Dosen so hoch waren ($0,1 \gamma/g$), daß es zu einer Pupillenerweiterung auf beinahe das Vierfache des Ausgangswertes kam, während in unseren Versuchen weit kleinere Dosen ($0,02 \gamma/g$) injiziert wurden, die die Pupille nur auf das Doppelte erweiterten. Die Wirksamkeit der von uns angewandten *Adrenalin* Dosen ist die gleiche wie die Wirksamkeit der von FORST und DEININGER angewandten *Nor-adrenalin* Dosen. Für Nor-adrenalin finden auch sie eine Verstärkung

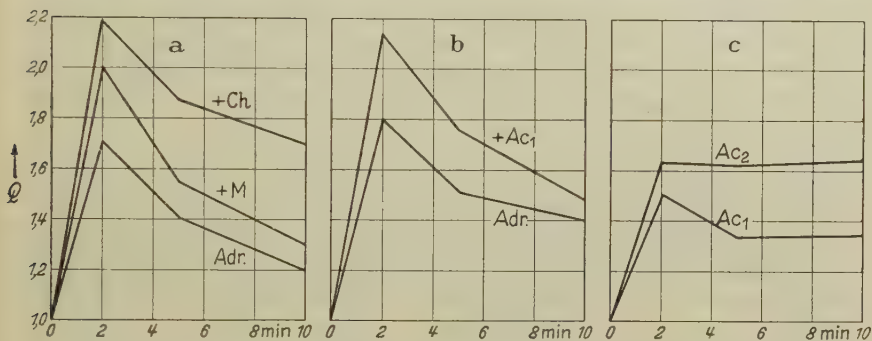


Abb. 4. Denervierte Mäusepupille. Adr. = $0,02 \gamma/g$ l-Adrenalin i.v.; M = $10 \gamma/g$ dl-Methionin i.v.; Ch = $15 \gamma/g$ Cholinchlorid i.v.; Ac₁ = $0,1 \gamma/g$, Ac₂ = $1 \gamma/g$ Acetylcholinchlorid i.v.

durch Acetylcholin. Der von den Autoren gefundene Unterschied in der Beeinflussbarkeit des Adrenalins und Nor-adrenalins durch die gleiche Acetylcholin Dosis — *Hemmung* der Adrenalinwirkung, *Verstärkung* der Nor-adrenalinwirkung — ist deshalb kein prinzipieller, sondern dadurch bedingt, daß die *Wirksamkeit* der verabfolgten Adrenalin- bzw. Nor-adrenalin Dosen so verschieden ist. Applizieren wir ähnlich hohe Adrenalin Dosen wie FORST und DEININGER, so erhalten auch wir durch Acetylcholin eine Abschwächung der Wirkung.

Für die Beantwortung der Frage nach dem Mechanismus, welcher der im einen Fall synergistischen, im anderen Fall antagonistischen Wirkung des Acetylcholins auf die adrenalin- bzw. nor-adrenalin-bedingte Mydriasis zugrunde liegt, muß berücksichtigt werden, daß die angewandte Acetylcholin Dosis von $0,1 \gamma/g$ nach den von FORST und DEININGER selbst mitgeteilten Beobachtungen, die wir bestätigen können (Abb. 4c), an der denervierten Mäusepupille mydriatisch wirkt. Das steht im Einklang mit kürzlich veröffentlichten Versuchen von RÜEGG und HESS sowie von KOELLA und RÜEGG an der *isolierten Irismuskulatur* verschiedener Tierarten, in denen Acetylcholin sowohl auf die Sphincter- als auf die Dilatormuskulatur eine Erregungswirkung ausübte, die am Dilator 10 mal

stärker als diejenige des Nor-adrenalins war. Aus einer Arbeit von McDOWALL (1947) geht sodann hervor, daß die bei der Katze nach intravenöser Injektion kleiner Adrenalin Dosen ($0,5 \gamma$) auftretende Pupillenerweiterung durch Acetylcholin verstärkt wird.

Der mydriatische Additionseffekt des Acetylcholins wird um so geringer sein, je stärker die von Adrenalin oder Nor-adrenalin schon verursachte Wirkung ist, und schließlich überhaupt nicht mehr in Erscheinung treten. Statt dessen kommt es sogar zu einer *Subtraktion* der Einzelwirkungen, wobei offen bleiben muß, ob die jetzt antagonistische Wirkung des Acetylcholins dadurch zustandekommt, daß die starke Mydriasis für die an der *Sphinctermuskulatur* angreifende *miotische* Wirkungskomponente des Acetylcholins eine günstigere „Ausgangslage“ bietet, oder ob es sich um einen Antagonismus am gleichen Substrat — der *Dilatorermuskulatur* — das eine Mal bei hohem, das andere Mal bei niedrigem Ausgangstonus handelt.

Eine wichtige Stütze für die von ihnen vertretene Auffassung, die Verstärkung der mydriatischen Wirkung des Nor-adrenalins durch Methionin, Cholin und Acetylcholin beruhe auf einer Methylierung zu Adrenalin, erblicken FORST und DEININGER darin, daß sich die Wirkung der „Methyldonatoren“ durch *Tellur* — als Abfangmittel für Methylgruppen — verhindern läßt. Mit den von ihnen angewandten Telluriddosen wird aber, wie wir fanden, nicht nur die durch Methyldonatoren verstärkte Arterenolmydriasis, sondern auch die Adrenalinmydriasis abgeschwächt. Auffällig ist, daß sowohl in den Versuchen der erwähnten Autoren als in unseren eigenen Versuchen die Abschwächung der Mydriasis durch Tellur so stark ist, daß sie sogar hinter der durch die beiden Sympathicusstoffe allein hervorgerufenen zurückbleibt. Wir hatten den Eindruck, daß die zur Erzielung des Effektes erforderlichen Dosierungen von Natriumtellurit ($2-3 \gamma/g$) toxisch wirken; $5 \gamma/g$ waren an unserem Tiermaterial tödlich.

Besprechung.

Wenn an Testobjekten wie z. B. dem isolierten Darm, der Nickhaut, der Irismuskulatur oder im Blutzuckertest am Kaninchen, an denen Nor-adrenalin eine schwächere Wirkung als Adrenalin besitzt, durch gleichzeitige Verabfolgung von Methionin, Cholin oder Acetylcholin, d. h. von Stoffen, die an sich die Funktion von Methyldonatoren ausüben können, — eine Verstärkung der Nor-adrenalinwirkung zustandekommt, so berechtigt das nicht ohne weiteres, das Ergebnis im Sinne einer Methylierung von schwächer wirksamem Nor-adrenalin zu wirksamerem Adrenalin zu deuten. Unsere Versuche haben gezeigt, daß die gleichen „Methyldonatoren“ auch die Adrenalinwirkung verstärken. Dieser Verstärkerwirkung kann keine Methylierung zugrunde liegen. Immerhin

bliebe einer Methylierungstheorie hier noch als Ausweg die Annahme offen, daß das hohe Angebot an Methylgruppen eine *Entmethylierung* des Adrenalins zu schwächer wirksamem Nor-adrenalin verhindert. Sie müßte dann aber den Beweis erbringen, daß neben den bekannten und gesicherten *oxydativen* Inaktivierungsmechanismen — Aminoxydase, Polyphenoloxydase — auch ein Entmethylierungsmechanismus am Abbau des Adrenalins maßgeblich beteiligt ist. Aber auch, wenn das zuträfe, würde nicht verständlich, weshalb die Methylendonatoren die Wirkung des Nor-adrenalins auch da verstärken, wo dieses gar nicht schwächer, sondern manchmal sogar stärker wirkt als Adrenalin, wie z. B. an der denervierten Nickhaut des Katzenauges.

Es ist deshalb notwendig, nach einer anderen Erklärung für die Verstärkerwirkung der „Methylendonatoren“ zu suchen. Diese finden wir für *Methionin* in seiner oxydationshemmenden Wirkung, die an dem Verstärkereffekt wenigstens beteiligt sein könnte; die Verstärkung der Adrenalin- und Nor-adrenalinwirkung an Nickhaut und Iris musculatur (Pupillenweite) durch die beiden anderen „Methylendonatoren“ — *Cholin* und *Acetylcholin* — möchten wir mit dem „pharmakodynamischen“ Synergismus erklären, der zwischen ihnen und den beiden Sympathicustoffen bei den angewandten Dosierungen besteht.

Zusammenfassung.

Die Verstärkung der pupillenerweiternden und blutzuckersteigernden Wirkung des Nor-adrenalins (Arterenols) durch Methylendonatoren — Methionin, Cholin, Acetylcholin — wurde von anderen Autoren im Sinne einer Methylierung von Nor-adrenalin zu Adrenalin gedeutet.

In Versuchen am Meerschweinchendarm und Kaninchenuterus sowie an der denervierten Mäusepupille und in Blutzuckerversuchen an Kaninchen fanden wir, daß in gleichem Maße wie die Nor-adrenalinwirkung auch die Wirksamkeit des Adrenalins durch die „Methylendonatoren“ verstärkt wird. Auch an der denervierten Nickhaut der Katze, an der die beiden Sympathicustoffe gleichwirksam sind, wird sowohl die Arterenol- als die Adrenalinwirkung durch die „Methylendonatoren“ verstärkt. Diese Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, daß dem durch Methionin, Cholin und Acetylcholin ausgeübten Verstärkereffekt eine Methylierung zugrundeliegt.

Weitere Versuche sprechen dafür, daß die Verstärkerwirkung des *Methionins* wenigstens zum Teil in seiner oxydationshemmenden Wirkung ihre Erklärung findet. Der Verstärkerwirkung des *Acetylcholins* an der Mäusepupille und an der Nickhaut der Katze dürfte ein pharmakodynamischer Synergismus zugrundeliegen, der an diesen Testobjekten zwischen den Sympathicustoffen und Acetylcholin in den angewandten Dosierungen besteht.

Literatur.

ENGELHARDT, A., u. K. GREEFF: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **220**, 211 (1953). — FORST, A. W., u. R. DEININGER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 354 u. 378 (1952). — GIERTZ, H., u. W. SCHILD: Klin. Wschr. **1952**, 421. — GREEFF, K., et P. HOLTZ: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 228 (1951). — HOLTZ, P., A. ENGELHARDT, K. GREEFF u. H. J. SCHÜMANN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **215**, 58 (1952). — HORNYKIEWICZ, O., u. G. NIEBAUER: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **218**, 448 (1953). — KOELLA, W., u. J. C. RÜEGG: Z. exper. Med. **118**, 390 (1952). — KREITMAIR, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **176**, 326 (1934). — LISSAK, K., u. J. MARTIN: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **196**, 558 (1940). — McDOWALL, R. J. S.: J. of Physiol. **106**, 1 (1947). — ROSENBLUETH, A.: Amer. J. Physiol. **100**, 443 (1932). — RÜEGG, J. C., u. W. R. HESS: Helvet. physiol. Acta **11**, 216 (1953). — SCHÜMANN, H. J.: Klin. Wschr. **1948**, 159. — Arch. exper. Path. u. Pharmacol. **206**, 164 u. 475 (1949).

Prof. Dr. P. HOLTZ, Frankfurt/Main, Weigertstr. 3.

Aus dem Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie
der Wissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. W. FRIEDRICH),
Abt. Pharmacologie, und aus dem Institut für Pharmacologie und Toxikologie
der Humboldt-Universität zu Berlin (Direktor: Prof. F. JUNG).

Pharmacologische Beeinflussung von Hauttransplantaten.

II. Mitteilung.

Von

PETER SCHÄFER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. September 1953.)

Ein Versuch, die Einheilung von Homotransplantaten der Haut durch Behandlung mit den Antihistaminen Avil, Thiantan und Soventol günstig zu beeinflussen, war an Mäusen erfolglos geblieben. Er schloß jedoch die Möglichkeit nicht aus, unter modifizierten Bedingungen eine günstige Wirkung auf die Homotransplantation zu erzielen.

Inzwischen haben BILLINGHAM, KROHN u. MEDAWAR das Zugrundegehen von Homotransplantaten der Haut am Kaninchen durch intramuskuläre Darreichung von Cortison-Acetat erheblich verzögern können. Die lokale Behandlung allein führte nur zu einer mäßigen Verzögerung des Transplantatstodes. Die Autoren erklären die Wirkung der generalisierten Cortisonbehandlung hauptsächlich mit einer Dämpfung der immunbiologischen Abwehrvorgänge. Für die geringe Wirkung einer lokalen Behandlung erwägen sie u. a. einen Antihistaminmechanismus. Damit stützen sie unsere Absicht, das bei den lokalen Antigen-Antikörper-Reaktionen mitspielende Histamin durch Behandlung mit Antihistaminen unschädlich zu machen und so die Einheilchance für Homotransplantate zu verbessern.

Im Gegensatz dazu hat KNAKE (1) das Schicksal von Milzhomotransplantaten durch Vorbehandlung der Milz-Spendertiere mit Histamin beeinflussen wollen. Diese Versuchsanordnung geht davon aus, daß das Verhalten der Gefäße für das Einheilen oder Nichteinheilen von Homotransplantaten entscheidend sein soll. Histamin soll die Gefäße offen halten. Ich entnehme der histologischen Beschreibung, daß die mit Histamin vorbehandelten Milztransplantate unter den Zeichen einer Gefäßstörung und Pulpakatabiose zugrunde gehen. Die Histaminvorbehandlung demonstriert demnach einen Teil jener Störungen, die wir durch Behandlung mit Antihistaminen verhindern wollten.

Ich habe nun an Ratten als widerstandsfähigeren und für Transplantationsversuche geeigneteren Tieren die Wirkung von *Rodismin* (= N'-Benzyl-N'-phenyl-N, N-diäthyläthylendiamin) und *Na-Salicylat* auf die Einheilung von homoplastisch frei verpflanzten Hautlappen geprüft. Rodismin (Deutsche Hydrierwerke Rodleben) soll weniger toxisch sein als das ihm verwandte Antihistamin Antergan (mit 2 Methyl- statt Äthylgruppen), was bei der von mir angewandten hohen Dosis wünschenswert

Tabelle 1.

	Mittlere Dosen in mg pro 100 g-Ratte		Mortalität		Einheilquoten					
	Einzel-dosis	Gesamt- dosis	Anzahl aller operierten Tiere	Mortalität am 16. Tag nach der Operation %	Mortalität am 60. Tag nach der Operation %	Anzahl der ausgewer- teten Tiere	Anzahl der Einhei- lungen	Relative Häufigkeit der Einhei- lungen %	Differenz der relativen Häufigkeit %	(erlaubte) maximale Grenz- differenz %
Rodismin										
(1.—6. Tag) I . . .	2,0	48,4	104	29	32	71	5	7	}	29
(3.—9. Tag) II . . .	2,0	55,0	115	23	28	83	6	7		
(6.—12. Tag) III . . .	2,0	50,0	101	28	33	68	3	4,5		
Na-Salizylat	8,6	224,0	65	20	29	46	6	13		
Komb. Behandlung . .			168	51	54	77	27	35		
(1.— 6. Tag) Rod. . .	1,9	41,5								20
(1.—10. Tag) Na-Sal. .	8,5	219,0								
Unbehandelt (Kontr.) .			116	12	14	100	6	6		

war. Die Behandlung wurde diesmal über längere Zeit fortlaufend, mit möglichst hohen Dosen durchgeführt. Da jede der Substanzen das Transplantationsergebnis günstig beeinflusste, wurden sie auch gleichzeitig angewandt.

Methodik.

1. Operation. 950 mm² große Bauchhautlappen (Cutislappen nach KRAUSE) wurden zwischen gleichgeschlechtlichen, nicht verwandten Tieren ausgetauscht. Die Transplantate wurden so eingenäht, daß die Haare im Falle der Einheilung gegen den Strich wuchsen. Ein Transplantat galt als eingeeilt, wenn mindestens 20% der Ausgangsgröße, also 200 mm², nach 60 Tagen Haarwuchs gegen den Strich zeigten. Der Zustand der Transplantate ist 60 Tage nach der Operation bezüglich der Einheilung endgültig. Über technische Einzelheiten und quantitative Auswertung siehe SCHÄFER (1), (2). Ferner wurde das Verhalten der Transplantate während der kritischen Einheilphase (um den 10.—12. Tag nach der Operation und später) laufend fotografisch protokolliert. Bis zum 10. (12.) Tag nach der Operation schützte ein Stärkeverband die Transplantate gegen äußere Einwirkungen. — Bauchhautlappen von 100—130 g schweren Ratten sind dünner als 800 μ . Damit war die auch für die erfolgreiche Homotransplantation der Haut unumgängliche Mitbedingung erfüllt [„kritische Verpflanzungsdicke“, SCHÄFER (2), (3)].

2. *Applikation*. *Rodismin* wurde 4—5mal täglich subcutan injiziert. Die Behandlung dauerte 6 Tage, und zwar für Versuchsreihe I vom 1. 6. Tag, für Reihe II vom 3.—9. Tag und für Reihe III vom 6.—12. Tag nach der Operation.

Na-Salicylat wurde intraperitoneal täglich um 7, 12 und 17 Uhr in Dosen von je 10,0 mg vom 3.—15. Tag nach der Operation injiziert.

Die *kombinierte Behandlung* führte den Tieren etwa die gleichen Dosen in gleicher Verteilung und für die gleiche Dauer wie in den einfachen Behandlungsschemen zu. Die Behandlung begann mit beiden Substanzen am 1. Tag, mit der Operation. *Rodismin* wurde 6, *Na-Salicylat* 10 Tage lang gegeben.

Aus der Tab. 1 ist zu ersehen, welche relativen Dosen die Tiere der verschiedenen Versuchsreihen im Mittel erhalten haben. Die *Mortalität* ist während und nach der Behandlung in allen Reihen hoch. Die kombiniert behandelten Tiere starben zu 24% an Verblutung aus der Stichwunde (Injektion) oder aus einer Bißwunde. Die Gesamtmortalität von 51% enthält also den Anteil von 24%, der nicht auf einer allgemeinen Giftwirkung, sondern auf einer speziellen Komplikation im Blutstillungsmechanismus beruht. *Rodismin* bzw. *Na-Salicylat* allein zeigten diese Wirkung nicht.

Ergebnis.

Kriterien für die Wirkung unserer Behandlungsmaßnahmen waren der Transplantatstod und die Dauereinheilung.

I. Qualitative Beschreibung des Transplantatstodes.

Hauthomotransplantate, die unter den obigen Bedingungen, aber *ohne* besondere Behandlung verpflanzt werden, heilen in einem sehr hohen Prozentsatz nicht ein. Sie können auf drei charakteristische Weisen zugrunde gehen.

1. Die *akute Totalnekrose* eines Transplantates läuft in 2—3 Tagen ab. Gewöhnlich beginnt sie am 8. und 9. Tag nach der Operation und ist am 10.—11. Tag beendet. Zuerst zeigen die Transplantate eine Verfärbung mit Nuancen von gelb über braun, rot bis blaurot. Sie sind verquollen und von pastöser Resistenz. Dann verschorft der Hautlappen rasch und tiefgreifend. Er wird pergamentartig, trocken und hart. Die schon begonnene Demarkation und Unterminierung des Lappens durch regenerierendes Epithel von der Wirtshaut her führt jetzt zur Abstoßung des mumifizierten Transplantates. Diesen Verlauf zeigt Abb. 1a—c.

2. Der *subchronische geschwürige Zerfall* läuft in 4—5 Tagen ab. Die initiale Verquellung tritt etwa am 10. Tage auf. Sie ist nicht von drastischen Verfärbungen begleitet. Die Transplantate sind lediglich blasser als die normale Haut und in wechselndem Grade verschuppt. Während der nun folgenden regressiven Veränderungen bleibt das Transplantat fest mit dem Transplantatsbett verbunden. Es wird kleiner und fester

(Schrumpfung). Seine Farbe ist bläulich-weiß, ein Farbton, der durch den Wucherungszustand der Epitheldecke und durch die mit der Schrumpfung verbundene Verdichtung des

Coriums bedingt sein muß. Die Schrumpfung schreitet fort, und schließlich treten Erosionen auf, die sich zu Geschwüren ausweiten. Vgl. hierzu Abb. 2a—e.

3. Der *chronische geschwürige Zerfall* dauert 6—12 Tage und beginnt auch am 10.—12. Tag nach der Operation. Es kommt ebenfalls zur festen Verbindung des Transplantates mit seiner Unterlage. Es stellen sich verzögert die gleichen Erscheinungen wie beim subchronischen Untergang ein. Vor dem Auftreten der Geschwüre können die Haare des geschrumpften Transplantates schon nachzuwachsen begonnen haben. Sie können leicht mit einem oberflächlichen epithelialen Schorf abgelöst werden. Dann liegt das bläulich-weiße, junge Epithel obenauf. Diese drei Degenerationsformen findet man bei unbeeinflussten und pharmakologisch beeinflussten Transplantaten in gleicher Weise. Unterschiede bestehen aber in der Verteilung der Degenerationsformen auf die verschiedenen Versuchsreihen. Bei den behandelten Transplantaten kann ein geschwüriger Zerfall noch 28 bis 35 Tage nach der Operation ein gut eingeheltes Transplantat zerstören. Eine solche Spätschädigung zeigt Abb. 4a—c. Andererseits gibt es auch einen akuten geschwürigen Zerfall. Innerhalb der verschieden schnell eintretenden ge-

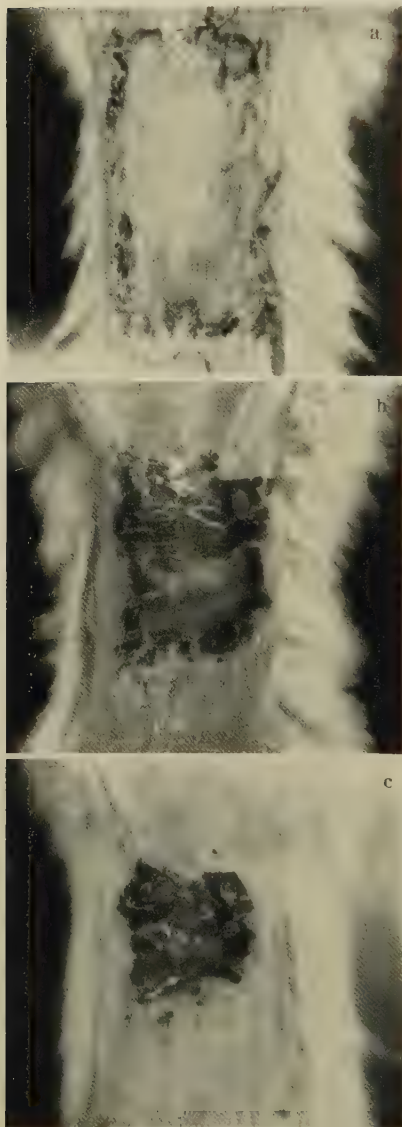


Abb. 1. Akute Totalnekrose: a = 8, b = 10, c = 12 Tage nach der Operation.

schwürigen Untergangsformen stellen die subchronischen und chronischen deutliche Häufigkeitsmaxima dar.

II. Quantitative Beschreibung des Transplantatsunterganges.

1. Tab. 2 (Spalte I—III) zeigt die zahlenmäßige Verteilung der akuten und chronischen Unterangsformen in den verschiedenen Versuchsreihen. Die subchronischen und chronischen Veränderungen wurden zu einer Gruppe zusammengefaßt, weil die Übergangsformen nicht exakt zugeordnet werden können. Als Ausdruck für die Zusammensetzung einer Versuchsreihe an chronischen und akuten Unterangsformen habe ich den Quotienten

$$\frac{\text{Anzahl der subchron. u. chron. Untergänge}}{\text{Anzahl der akuten Totalnekrosen}}$$

gebildet. Die Rodisminbehandlung vom 3.—9. Tag (II) und vom 6. bis 12. Tag (III), besonders aber die Darreichung von Na-Salicylat bewirken eine Zunahme der chronischen

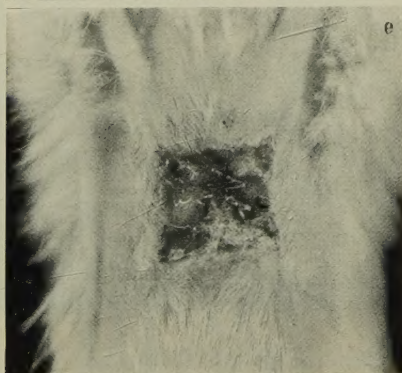
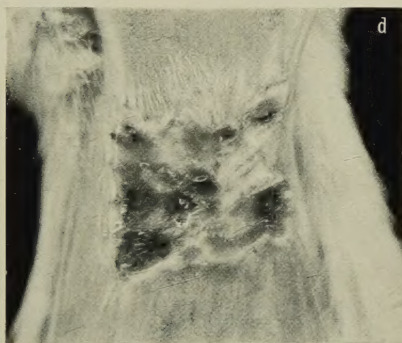
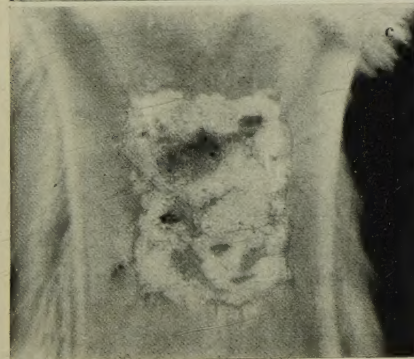
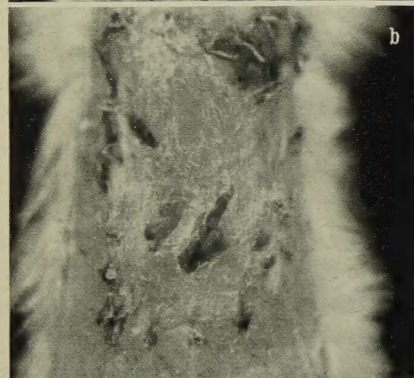
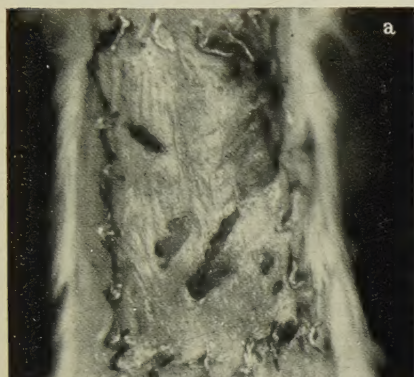


Abb. 2. Subchronischer geschwüriger Zerfall:

$a = 8$, $b = 10$, $c = 13$, $d = 15$, $e = 17$ Tage nach der Operation.

Tabelle 2.

	Akute Untergänge I	Chronische Untergänge II	Quotient chronische akute III	Verteilung d. akuten Totalnekrosen auf Tag nach d. Operation							50%-Termin (vgl. Text) Tag nach d. Operat. XI
				8. IV	9. V	10. VI	11. VII	12. VIII	13. IX	14. X	
Rodismin											
(1.—6. Tag) I . . .	20	10	0,50	—	—	3	6	8	3	—	11.—12.
(3.—9. Tag) II . . .	31	24	0,77	6	6	8	5	6	—	—	10.
(6.—12. Tag) III. . .	33	25	0,76	1	2	14	13	2	1	—	10.—11.
Na-Salizylat	16	31	2,00	—	—	—	—	—	—	—	—
Komb. Behandlung . .	14	12	0,86	—	—	1	4	4	3	2	12.
Unbehandelt (Kont.) .	21	10	0,48	1	8	8	3	1	—	—	9.—10.

Untergangsformen; ebenso wirkt die kombinierte Behandlung.

2. Ein anderer quantitativer Gesichtspunkt liegt den Spalten IV bis X in Tab. 2 zugrunde. Sie zeigen die Anzahl der am 8., 9., . . . Tag nach der Operation voll ausgebildeten Totalnekrosen (Stadium der Verschorfung bzw. des Pergamentlappens). Bemerkenswert ist die Verzögerung des Nekroseintritts unter Rodismin-Behandlung vom 1.—6. Tag und bei der kombinierten Behandlung, die ebenfalls Rodismin während des 1. bis 6. Tages nach der Operation zuführt. Auffallend und schwer erklärbar ist die Häufigkeitsverteilung unter der Rodismin-Behandlung vom 3.—9. Tag, da sie kein Maximum zeigt. Die Rodismin-Behandlung vom 6.—12. Tag nach der Operation bringt auch noch eine geringe Verzögerung des Nekroseintritts. — An Hand dieser Tabelle ist es möglich, nach Art der Toxizitätsbestimmungen die Versuchsreihen durch denjenigen Zeitpunkt zu charakterisieren, an dem 50% der akut sterbenden Transplantate das eben schon ausgebildete Nekrotestadium zeigen. Dieser kritische Termin ist in Spalte XI der Tab. 2 angegeben.

Die Charakterisierung des Behandlungseffektes geschieht am besten durch die drei Möglichkeiten gemeinsam, weil jede dieser quantitativen Urteile etwas anderes aussagt. So sind z. B. die Transplantate der Rodisminreihen II und III am 11. Tag zu 50% in gleicher Weise eindeutig nekrotisch, die Häufigkeitsverteilung auf die Tage nach der Operation aber ist verschieden.

III. Dauereinheilung.

Als dauernd eingeheilt galt ein Transplantat, wenn 20% seiner Ausgangsgröße

mit seinen ursprünglichen Merkmalen Epitheldecke, Hautdicke und Haarwuchs am 60. Tage nach der Operation erhalten war. Die Erfahrung hat gelehrt, daß der Haarwuchs allein ein brauchbares Symptom für die Einheilung ist (Abb. 3).



Abb. 3.

Abb. 3. Ein unter Rodismin-Na-Salicylat-Behandlung eingeheltes Transplantat mit Haarwuchs gegen den Strich: $a = 8$, $b = 12$, $c = 20$ Tage nach der Operation.

Auf eine detaillierte Beurteilung vieler und auch wesentlicher Lebensfunktionen des Transplantates habe ich absichtlich verzichtet. Das entspricht den vorliegenden experimentellen Bedürfnissen. Ich möchte im allgemeinen davon abraten, die Einheilsymptomatik durch unsicher zu beurteilende Merkmale zu vergrößern. Vergleiche jedoch BILLINGHAM, KROHN u. MEDAWAR sowie KNAKE (2): Unser Kriterium ist eine praktische Lösung. Es leistet für die Beurteilung einer Dauereinheilung an

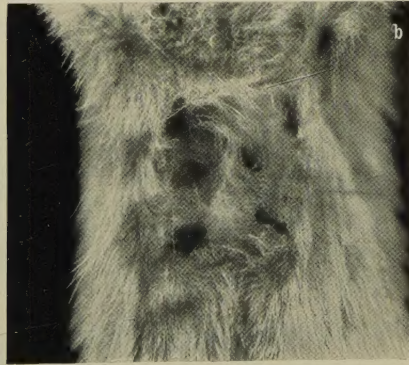
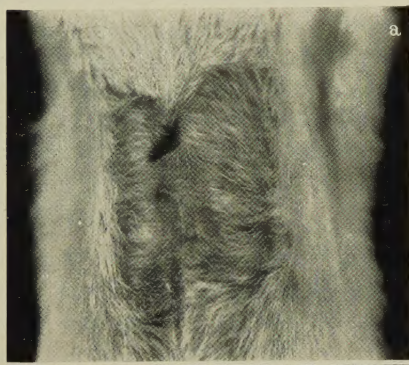


Abb. 4.

Abb. 4. Spätschädigung: $a = 28$, $b = 32$ Tage nach der Operation.

Hauttransplantaten mehr als die histologische Untersuchung und erlaubt eine quantitative Auswertung.

Die Beobachtung, daß eine Rodismin-Behandlung und eine Na-Salicylat-Behandlung den akuten Nekrosetod von Homotransplantaten deutlich verzögern bzw. ihn in chronische Untergangsformen abwandeln, veranlaßte mich, die beiden Mittel gleichzeitig zu geben. Diese Behandlung hatte einen sicheren, günstigen Effekt auf die Dauereinheilung von Hauttransplantaten, die zwischen heterozygoten gleichgeschlechtlichen Tieren ausgetauscht worden sind. In Tab. 1 wurden die Einheilquoten der behandelten Tiere untereinander und mit der Einheilquote der unbehandelten Tiere verglichen. Die gleichzeitige Darreichung von Rodismin und Na-Salicylat hat eine statistisch sichere Abweichung um 30% von den unbehandelten Tieren ergeben. Die statistische Berechnung wurde nach KOLLER durchgeführt.

IV. Nebenbefund.

Die kombinierte Behandlung mit Na-Salicylat und Rodismin bewirkte eine Blutungsneigung, der ein erheblicher Teil der Versuchstiere zum Opfer fiel (Verblutungstod nach Injektion). Dieses Phänomen wird zur Zeit genau untersucht und kann für die Hypothese, nach welcher die Gefäße primär das Schicksal von Homotransplantaten bestimmen sollen [KNAKE(2)], von entscheidender Bedeutung sein.

Zusammenfassung.

Rodismin und *Na-Salicylat* allein bewirken eine Abwandlung der Untergangsformen von Hauthomotransplantaten und eine Verzögerung ihres endgültigen Unterganges. Die kombinierte Darreichung beider Substanzen führt darüber hinaus zu einer statistisch sicheren Verbesserung der Dauereinheilung von 6% auf 35% der Fälle.

Literatur.

BILLINGHAM, R. E., P. L. KROHN and P. B. MEDAWAR: Brit. Med. J. **1**, 1157 (1951); **2**, 1049 (1951). — KIRCHHEIM, J.-H., u. P. SCHÄFER: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 256 (1951). — KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, Leipzig 1943. — KNAKE, E.: (1) Z. Naturforsch. **8b**, 324 (1953) — (2) **8b**, 298 (1953). — MORGAN, I. A.: Surg. etc. **30**, 506 (1951). — SCHÄFER, P.: (1) Virchows Arch. **317**, 484 (1949). — (2) Dtsch. Gesundheitswesen **7**, 490 (1952). — (3) Virchows Arch. **320**, 397 (1951).

Dr. Dr. PETER SCHÄFER, Berlin-Buch, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Inst. f. Med. u. Biol.